



Ana Sofia da Silva Sequeira

Licenciada em Química Aplicada

Desenvolvimento de uma membrana de fibras para conversão enzimática de CO₂

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Bioquímica

Orientador: Prof. Doutor João Paulo Borges, Professor
Auxiliar, FCT-UNL

Co-orientador: Doutora Rita Craveiro, Investigadora Pós-
Doc, FCT-UNL

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Pedro António de Brito Tavares

Arguente(s): Doutor Ana Catarina Bernardino Baptista

Vogal(ais): Doutora Rita Paula Paiva Craveiro



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Março de 2018

Ana Sofia da Silva Sequeira

Licenciada em Química Aplicada

**Desenvolvimento de uma membrana de
fibras para conversão enzimática de
CO₂**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Bioquímica

Orientador: Prof. Doutor João Paulo Borges, Professor
Auxiliar, FCT-UNL

Co-orientador: Doutora Rita Craveiro, Investigadora Pós-
Doc, FCT-UNL

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Pedro António de Brito Tavares

Arguente(s): Doutor Ana Catarina Bernardino Baptista

Vogal(ais): Doutora Rita Paula Paiva Craveiro

Março de 2018

DESENVOLVIMENTO DE UMA MEMEBRANA DE FIBRAS PARA CONVERSÃO ENZIMÁTICA DE CO₂

Copyright @ 2018 – Ana Sofia da Silva Sequeira, da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa e da Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

AGRADECIMENTOS

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.” (Arthur Schopenhauer)

Gostaria de começar por agradecer à Prof. Doutora Susana Barreiros e ao meu orientador Prof. Doutor João Paulo Borges por me terem aceite nos seus laboratórios, dando-me a oportunidade de estudar e trabalhar em duas áreas distintas, mas que juntas podem revolucionar o mundo. Obrigada pela disponibilidade e pelos valiosos conselhos que enriqueceram esta dissertação.

Um obrigada especial à minha co-orientadora Rita Craveiro por toda a paciência, pela amizade, pelo apoio, pelos conselhos e principalmente pelo ânimo nos dias menos bons, quando nada parecia resultar. Obrigada por me ajudares a desenvolver este trabalho da melhor forma.

Ao Alexandre Paiva, por todo o conhecimento transmitido, pelos conselhos assertivos, pela simpatia e por todo o apoio. Obrigada por tornares o ambiente fácil e descontraído fazendo com que qualquer pessoa queira voltar a trabalhar convosco.

A toda a minha família, obrigada pelo apoio incondicional e por nunca me deixarem desistir, em particular à minha irmã de coração que todos os dias faz de mim uma pessoa melhor e me ajuda a crescer. Um agradecimento especial ao Ricardo, por não ser só um namorado, mas acima de tudo o meu melhor amigo. Obrigada por toda a paciência e compreensão, por aturares todos os meus momentos de mau humor quando as coisas não corriam bem no laboratório. Acima de tudo, obrigada por estares sempre do meu lado incondicionalmente.

Às minhas amigas de uma vida Carolina e Cíntia, por todos estes anos de amizade, por me ouvirem e por me apoiarem, estando sempre presentes em cada jornada da minha vida.

À minha colega e amiga Carolina Marchante, obrigada por estes 7 anos de amizade e companheirismo. Concluímos juntas esta etapa e espero poder continuar a estar presente nos momentos mais importantes.

Ao Rafael Veroneze, parece impossível como em apenas três meses tiveste um papel tão importante. Obrigada por teres tornado mais divertidos aqueles dias chatos e desesperantes de eletrospinning, em que num dia funcionava e noutro já não sem qualquer razão aparente, temos apenas de aceitar. Obrigada não teres sido só um colega, mas sim um amigo.

Ao Nuno e ao Pedro, por terem tornado este mestrado mais divertido. Sem vocês, não teria sido a mesma coisa, obrigada por se terem tornado ótimos companheiros nesta caminhada. “La família” sempre.

Às minhas amigas, Vanessa, Catarina, Alice e Marina por poder contar sempre com o vosso apoio. São a prova que a distância não conta quando a amizade é verdadeira.

Aos meus colegas do Lab. 427, Francisca, Bruno, Liane e Mónica, obrigada pelos momentos de descontração e pela ajuda prestada sempre que precisei. Obrigada por tornarem me terem posto à vontade desde o primeiro dia, tornando o ambiente do laboratório mais alegre.

Por último, a todos aqueles com quem tive a oportunidade me cruzar durante o meu percurso académico e que de alguma forma o tornaram mais rico, termino este ciclo de coração cheio.

RESUMO

O aumento dos níveis de emissões de dióxido de carbono (CO_2) tem tido consequências graves como as alterações climáticas. Este fator associado ao facto de o CO_2 ser também uma matéria-prima abundante e barata, leva à necessidade de desenvolver estratégias que possibilitem a captura e transformação de CO_2 em produtos de valor acrescentado, como por exemplo o metanol.

O principal objetivo desta tese consiste na conversão de CO_2 em metanol, através de um sistema multienzimático imobilizado. No entanto, por se tratar de um sistema complexo, este trabalho foca-se apenas numa parte do sistema. Assim, foi analisada a atividade da enzima álcool desidrogenase (ADH) quando encapsulada. A enzima foi imobilizada numa membrana de fibras produzida pela técnica de eletrospinning. O polímero utilizado para produção das fibras foi o álcool polivinílico (PVA).

A atividade desta enzima depende do substrato utilizado, sendo maior em etanol. Deste modo utilizou-se etanol para otimizar os parâmetros reacionais. Para a quantificação/deteção da atividade enzimática utilizou-se um método indireto, através da conversão de NAD^+ a NADH (cofatores da enzima), recorrendo à espectroscopia de ultravioleta/visível (UV/Vis).

De modo a caracterizar as fibras obtidas utilizaram-se diversas técnicas tais como microscopia eletrónica de varrimento (SEM), testes reológicos (viscosidade), testes mecânicos (ensaio de tração) e espectroscopia de infravermelho (FTIR). A conjugação das informações obtidas permitiu verificar que a enzima consegue estar encapsulada no interior das fibras influenciando a sua formação no processo de electrospinning.

Palavras-chaves: Dióxido de carbono, imobilização enzimática, oxidoreductases, NADH, eletrospinning.

ABSTRACT

Rising levels of carbon dioxide (CO₂) emissions have led to serious consequences such as climate change. This factor, coupled with the fact that CO₂ is also an abundant and cheap raw material, leads to the need to develop strategies that allow the capture and transformation of CO₂ into high added value products, such as methanol.

The main objective of this thesis is the conversion of CO₂ into methanol through an immobilized multienzymatic system. However, because this is a complex system, this work focuses only on one part of the system. Thus, the activity of the enzyme alcohol dehydrogenase (ADH) when encapsulated was analyzed. The enzyme was immobilized on a fiber membrane produced by the electrospinning technique. The polymer used to produce the fibers was polyvinyl alcohol (PVA).

The activity of this enzyme differs with the type of substrate used, being higher in ethanol. In this way, ethanol was used to optimize the reaction parameters. For the quantification/detection of the enzymatic activity an indirect method was used, through the conversion of NAD⁺ to NADH (enzyme cofactors), using ultraviolet/visible spectroscopy (UV/vis).

In order to characterize the obtained fibers, several techniques were used such as scanning electron microscopy (SEM), rheological tests (viscosity), mechanical tests (tensile tests) and infrared spectroscopy (FTIR). The obtained information allowed to verify that the enzyme can be encapsulated inside the fibers influencing its formation in the electrospinning process.

Keywords: Carbon dioxide, enzymatic immobilization, oxidoreductases, NADH, eletrospinning.

ÍNDICE GERAL

Agradecimentos.....	vi
Resumo	viii
Abstract	x
Índice geral	xii
Lista de Figuras	xvi
Lista de Tabelas	xviii
Abreviaturas	xx
1. Introdução	3
1.1. Química Verde	3
1.2. Dióxido de carbono.....	4
1.3. Metanol.....	8
1.4. Conversão de CO ₂ a metanol	10
1.4.1. Conversão Enzimática de CO ₂ a metanol	11
1.5. Biocatálise	13
1.5.1. Oxidoredutases.....	14
1.5.2. ADH.....	14
1.6. Imobilização de enzimas	15
1.7. Electrospinning	20
2. Materiais e métodos	25
2.1. Electrospinning	25
2.1.1. Químicos/Materiais	25
2.1.2. Preparação das soluções	25
2.1.3. Instalação de Electrospinning.....	26
2.1.4. Condições de electrospinning	26
2.2. Métodos de caracterização	27
2.2.1. Caracterização Reológia	27
2.2.2. Caracterização Mecânica.....	27

2.2.3.	Caracterização Química	29
2.2.3.1.	Espectroscopia de Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)	
	29	
2.2.4.	Caracterização Morfológica	29
2.2.4.1.	Microscopia Eletrônica de Varrimento (SEM).....	29
2.3.	Estudos enzimáticos.....	31
2.3.1.	Método colorimétrico – Ensaio do MTT.....	32
2.3.2.	Atividade Enzimática	33
2.3.2.1.	Medição da atividade da enzima livre em solução	33
2.3.2.2.	Medição da atividade da enzima imobilizada na fibra	34
2.4.	Imobilização enzimática.....	34
2.5.	Método de Lowry.....	35
2.6.	Perda de Massa.....	36
3.	Resultados e discussão.....	39
3.1.	Electrospinning	39
3.1.1.	Álcool polivinílico (PVA).....	39
3.1.2.	Produção de fibras por electrospinning	39
3.1.3.	Caracterização Reológica.....	41
3.1.4.	Caracterização Mecânica.....	42
3.1.5.	Caracterização Química	43
3.1.5.1.	FTIR-ATR	43
3.1.6.	Caracterização Morfológica.....	44
3.1.6.1.	SEM.....	44
3.2.	Ensaio enzimático	46
3.2.1.	Imobilização enzimática	48
3.2.2.	Atividade Enzimática	49
3.2.1.	Perda de massa	51
	Conclusões.....	54
	Perspetivas futuras	56

Bibliografia.....	58
Apêndices	64

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Ciclo do carbono. Adaptado de ³	4
Figura 1.2. Concentração de CO ₂ na atmosfera - Curva de Keeling ⁷	5
Figura 1.3. Tecnologias de captura de CO ₂ . Adaptado de ¹⁰	6
Figura 1.4. Técnicas de separação de CO ₂	7
Figura 1.5. Consumo mundial de metanol ¹⁵	9
Figura 1.6. Conversão enzimática de CO ₂ a metanol	12
Figura 1.7. Diferentes abordagens para a obtenção de enzimas imobilizadas sem suporte: (a) cristalização, (b) agregação; (c) secagem por atomização; e (d) reticulação direta. CRY, cristais de enzima; AGG, agregados enzimáticos; SDE: enzima atomizada; CLECs, cristais de enzima reticulados; CLEAs, agregados enzimáticos reticulados; CSDEs, enzimas atomizadas reticuladas; CLEs, enzimas solubilizadas reticuladas. Adaptado de ⁴²	18
Figura 1.8. Montagem laboratorial de electrospinning	20
Figura 1.9. Imagens SEM de fibras de PVA com diferentes diâmetros ⁴⁶	21
Figura 2.1. Exemplo de curva de tração obtida para uma amostra de fibras de PVA ...	28
Figura 2.2. Montagem experimental da máquina de tração	28
Figura 2.3. Diferentes sinais produzidos pela interação de um feixe de elétrons de alta energia e uma amostra. Adaptado de ⁵⁰	30
Figura 2.4. Espectro de absorção UV-vis de NAD ⁺ e NADH ⁶¹	31
Figura 2.5. Reação de formação de acetaldeído a partir de etanol.....	32
Figura 2.6. Reação MTT	32
Figura 3.1. Aspeto das fibras obtidas. A – Após a recolha; B – Após a separação.....	41
Figura 3.2. Gráfico de viscosidade das soluções de PVA 9,5% (w/v) e PVA 9,5% (w/v) + ADH (10 mg/ml).....	41
Figura 3.3. Curvas de tração obtidas para as fibras de PVA 9,5% (w/v) e de PVA 9,5% (w/v) com a enzima ADH (10 mg/mL)	42
Figura 3.4. Espectros FTIR-ATR das amostras em estudo	44
Figura 3.5. A – Imagem SEM de uma fibra de PVA 9,5% (w/v) dissolvido em TBS; B - Ampliação da região assinalada a laranja	44

Figura 3.6. Imagens SEM de uma fibra de PVA 9,5% (w/v) (com uma ampliação de 2500x à esquerda e de 10000x à direita)	45
Figura 3.7. Imagens SEM de fibras de PVA 9,5% (w/v) com enzima: A - [ADH]=1 mg/ml; B - [ADH]=10 mg/ml com uma ampliação de 10000x	45
Figura 3.8. Curva de calibração para a enzima ADH	46
Figura 3.9. Teste de atividade enzimática	47
Figura 3.10. Comportamento do NAD ⁺ em água ou etanol ao longo do tempo	48
Figura 3.11. Gráfico da produção de NADH em função do tempo para o estudo da atividade da enzima livre ($y = 0,0214x + 37,942$) enzima imobilizada (1ª utilização) ($y = 0,0831x + 6,7524$)	49
Figura 3.12 Gráfico da produção de NADH em função do tempo para o estudo da atividade da enzima livre ($y = 0,385x + 0,2347$); enzima imobilizada (1ª utilização) ($y = 2,3128x + 1,9614$)	50
Figura 3.13. Gráfico da produção de NADH em função do tempo para o estudo da atividade da enzima imobilizada - 1ª utilização ($y = 2,3128x + 1,9614$) e da enzima imobilizada - 2ª utilização ($y = 1,21x + 1,754$)	51
Figura 4.1. Reação de conversão enzimática de CO ₂ a metanol.....	56
Figura 6.1. Reta de calibração utilizadas para a quantificação de proteína total das fibras com enzima imobilizada pelo método de Lowry.....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1. Princípios da Química Verde	3
Tabela 1.2. Classificação de enzimas pelo tipo de reação química que catalisam ³²	13
Tabela 1.3. Vantagens e desvantagens dos métodos de imobilização enzimática	19
Tabela 2.1. Parâmetros testados	26
Tabela 3.1. Parâmetros utilizados para a obtenção de membranas de fibras	40
Tabela 3.2. Valores de viscosidade ($\text{Pa}\cdot\text{s}^{-1}$) das soluções testadas	41
Tabela 3.3. Resultados dos testes mecânicos	42

ABREVIATURAS

ADH	Álcool desidrogenase
AldDH	Aldeído desidrogenase
ATR	Attenuated total reflectance
BSA	Bovine Serum Albumin
CH ₃ OH	Metanol
CO	Monóxido de carbono
CO ₂	Dióxido de carbono
ESCA	Espectroscopia eletrónica para análise química
FaldDH	Formaldeído desidrogenase
FDH	Formato desidrogenase
FTIR	Fourier transform infrared spectroscopy
MBTE	Metil tetra-butil éter
MDH	Metanol desidrogenase
MTO	Metanol para olefinas
MTP	Metanol para propileno
MTT	Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide
MV ²⁺	Metil viologénio
NAD ⁺	β-Nicotinamide adenine dinucleotide
NADH	β-Nicotinamide adenine dinucleotide, reduced disodium salt hydrate
NADP ⁺	β-Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NADPH	β-Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate hydrate
PBS	Tampão fosfato salino
PMS	Phenazine methosulfate
ppm	Partes por milhão
PQQ	Pirroloquinolinaquinona
PVA	Álcool polivinílico
PVAc	Acetato polivinílico
SEM	Scanning electron microscopy
TBS	Tampão tris salino
Tris	2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol
UV/vis	Espectroscopia de Ultravioleta/visível
YADH	Álcool desidrogenase de levedura
XPS	Espectroscopia de fotoeletrões de raios-X
% (w/v)	Percentagem massa por volume

Capítulo 1

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. Química Verde

A química verde ou química sustentável tem por base o desenvolvimento e aplicação de produtos químicos e processos, que permitem reduzir ou eliminar, o uso e o desenvolvimento de substâncias perigosas para a saúde humana e para o meio ambiente.¹

O elevado consumo dos derivados de petróleo pelos países desenvolvidos levantou questões ambientais, nomeadamente devido aos altos níveis de emissões e concentração de dióxido de carbono na atmosfera, que têm como principal consequência as alterações climáticas. Estas preocupações originaram, desde os anos setenta, diversos movimentos para a criação de medidas que promovem a sustentabilidade de processos químicos, a virem a ser usadas a nível industrial, tais como a química verde. Os diversos projetos e programas criados ao longo dos anos deram origem a um consenso sobre os principais pontos ou princípios básicos da química verde. A Tabela 1.1. descreve os 12 princípios da química verde.¹

Tabela 1.1. *Princípios da Química Verde*

Princípios da Química Verde
1. Prevenção
2. Economia de Átomos
3. Síntese de Produtos Menos Perigosos
4. Desenvolvimento de Produtos Seguros
5. Solventes e Auxiliares Mais Seguros
6. Procura pela Eficiência de Energia
7. Uso de Fontes Renováveis de Matéria-Prima
8. Evitar a Formação de Derivados
9. Catálise
10. Produtos Degradáveis
11. Análise em Tempo Real para a Prevenção da Poluição
12. Química Intrinsecamente Segura para a Prevenção de Acidentes

A filosofia da química verde é já popular e é já implementada em vários processos. No entanto, é importante perceber que estes princípios devem ser aplicados de forma consistente e não apenas como objetivos independentes. É por isso que este tema é cada vez mais abordado a nível do ensino, para que estes princípios estejam presentes no dia-a-dia e que cada pessoa possa assim contribuir para uma química mais sustentável.¹

1.2. Dióxido de carbono

O dióxido de carbono (CO_2) é um gás abundante na atmosfera terrestre, e a sua presença é importante em vários aspetos. Na natureza as plantas utilizam a energia solar e água como catalisadores para reciclar o dióxido de carbono transformando-o em compostos orgânicos, no entanto este processo demora milhares de anos, não sendo por isso suficiente para converter e fixar todo o CO_2 produzido atualmente.² O CO_2 está ainda presente na água, nos solos, em sedimentos, combustíveis fósseis, entre outros, formando um ciclo essencial à vida – o ciclo do carbono (Figura 1.1).

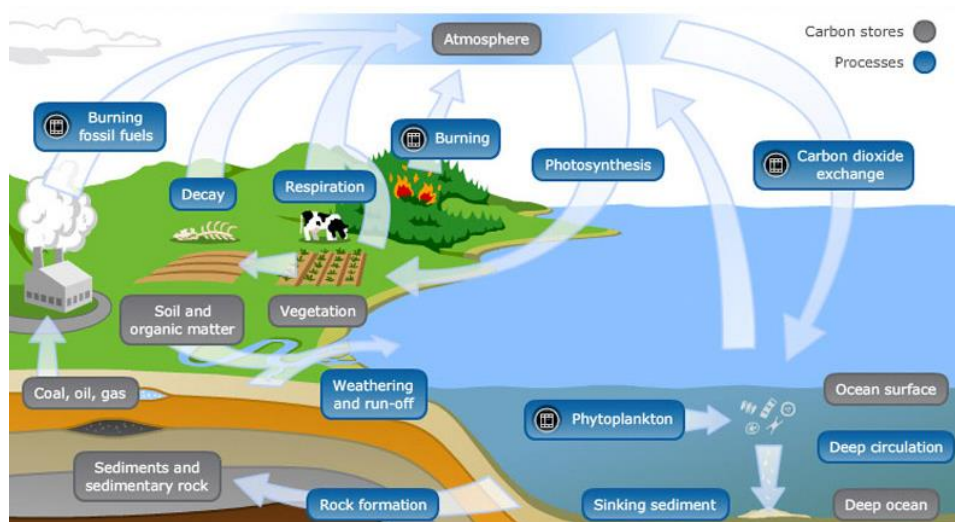


Figura 1.1. Ciclo do carbono. Adaptado de³

Os níveis de emissão deste gás têm vindo a aumentar significativamente nas últimas décadas. O crescimento da economia e da população têm levado a um aumento de consumo de energia, combustíveis e recursos fósseis por parte da humanidade, tornando-se num impacto negativo para o ambiente. Este maior consumo de

combustíveis fósseis, eleva os níveis de dióxido de carbono na atmosfera, contribuindo assim para o efeito de estufa. Este efeito e o consequente aquecimento global, têm consequências negativas graves que podem levar a ocorrência de alterações climáticas e vários desastres naturais.⁴

Devido às suas elevadas concentrações na atmosfera, o CO₂ pode ser considerado um poluente atmosférico. É assim necessário desenvolver tecnologias de interesse para captura e reutilização deste gás, permitindo a sua utilização como fonte de produção de novos produtos. A conversão eficiente de CO₂ atmosférico em combustíveis oferece benefícios tanto na fixação de gases com efeito de estufa como na produção de combustíveis e produtos químicos.⁵

Devido ao considerável aumento do uso de veículos motorizados, como carros ou comboios, construções fabris e outras atividades que envolvam o consumo de combustíveis fósseis como carvão ou petróleo, as emissões originadas pela atividade humana tem vindo a aumentar desde a revolução industrial (sec. XVIII)⁶. Em 2017 a concentração de CO₂ na atmosfera alcançou um novo recorde, atingido as 405,91 ppm (partes por milhão) ultrapassando assim as 403,3 ppm do ano anterior. A curva de Keeling da Figura 1.2. mostra como o aumento da concentração do CO₂ tem sido significativo.⁷

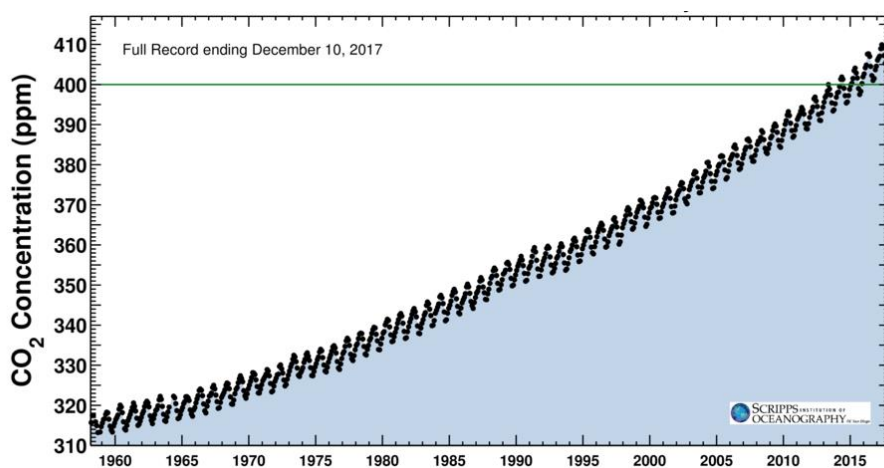


Figura 1.2. Concentração de CO₂ na atmosfera - Curva de Keeling⁷

O constante crescimento da população, desenvolvimento das grandes cidades e a consequente desflorestação do planeta, reduz os espaços verdes disponíveis diminuindo a capacidade natural de converter o CO₂ da atmosfera. Hoje em dia, o

consumo de combustíveis fósseis já ultrapassou a capacidade natural que o planeta tem de regenerar esses compostos que levam milhões de anos a serem produzidos. A

A captura de dióxido de carbono proveniente dos gases de combustão das centrais térmicas é uma das questões mais importantes da atualidade no sentido de se tentar solucionar o problema do aquecimento global. Existem três tipos de tecnologias de captura de CO_2 – pré-combustão, pós-combustão e oxí-combustão (Figura 1.3).^{8,9}

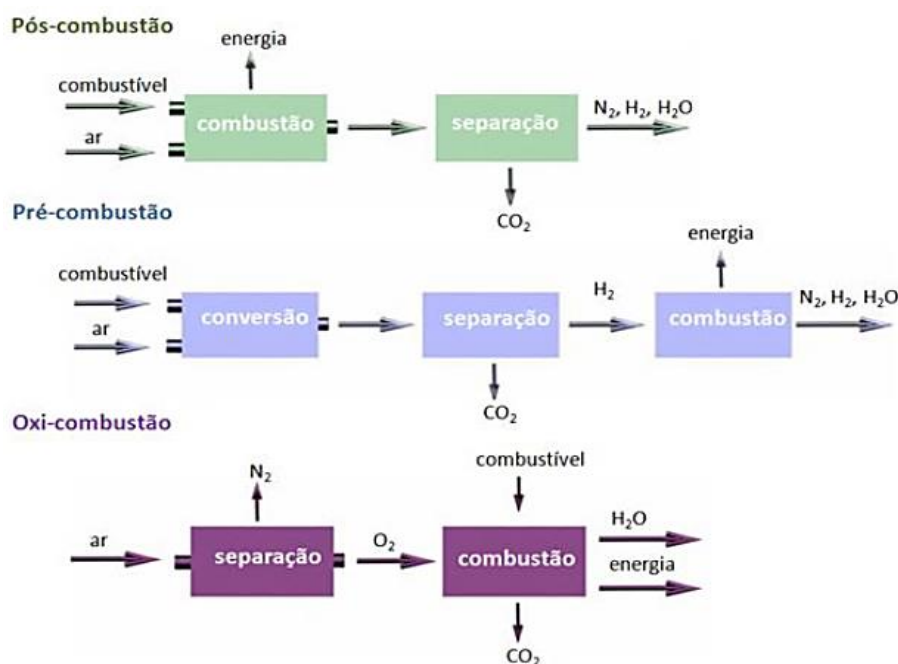


Figura 1.3. Tecnologias de captura de CO_2 . Adaptado de¹⁰

A tecnologia de pós-combustão consiste na separação de CO_2 dos gases de combustão após a queima do combustível na presença de ar. As vantagens deste tipo de tecnologia é a sua possível utilização para outras aplicações, como a separação de CO_2 a partir de gás natural, e possibilidade de se adaptar às instalações industriais já existentes. Contudo por se tratar de um processo de elevado custo, estão a ser desenvolvidas alternativas que incluem solventes e membranas químicas mais eficientes para a separação, bem como materiais que permitam reduzir os custos.^{8,9}

A pré-combustão pode oferecer custos mais baixos e uma maior eficiência. Neste caso, o combustível é gaseificado (parcialmente queimado) com uma determinada quantidade de oxigênio a pressões elevadas, produzindo-se uma mistura de $\text{CO} + \text{H}_2$. Durante o processo de gaseificação é produzida uma corrente de CO_2 quase pura. A gaseificação é uma tecnologia bem estabelecida nas indústrias de fabricação e refinação

de produtos químicos, o que constitui uma grande vantagem na implementação deste tipo de captura.^{8,9} Outra vantagem desta técnica é a combinação com a produção de H₂ permite a sua utilização no setor de transportes.

No processo de oxi-combustão, o combustível é queimado na presença de oxigénio puro em vez de ar, evitando deste modo a necessidade de separar os CO₂ de N₂ nos gases de exaustão, que consistem numa mistura de CO₂ e água. A vantagem da oxi-combustão é que, tal como na pós-combustão, é possível modernizar as instalações existentes de forma a aplicar esta tecnologia. No entanto, é ainda uma tecnologia limitada devido aos elevados custos de materiais avançados e ambientes operacionais que possam suportar as temperaturas elevadas necessárias.^{8,9}

Após a sua captura, o CO₂ tem de ser totalmente separado. Essa separação é feita por diversas técnicas associadas às tecnologias acima referidas. A Figura 1.4 descreve as várias técnicas utilizadas na separação de CO₂.¹⁰

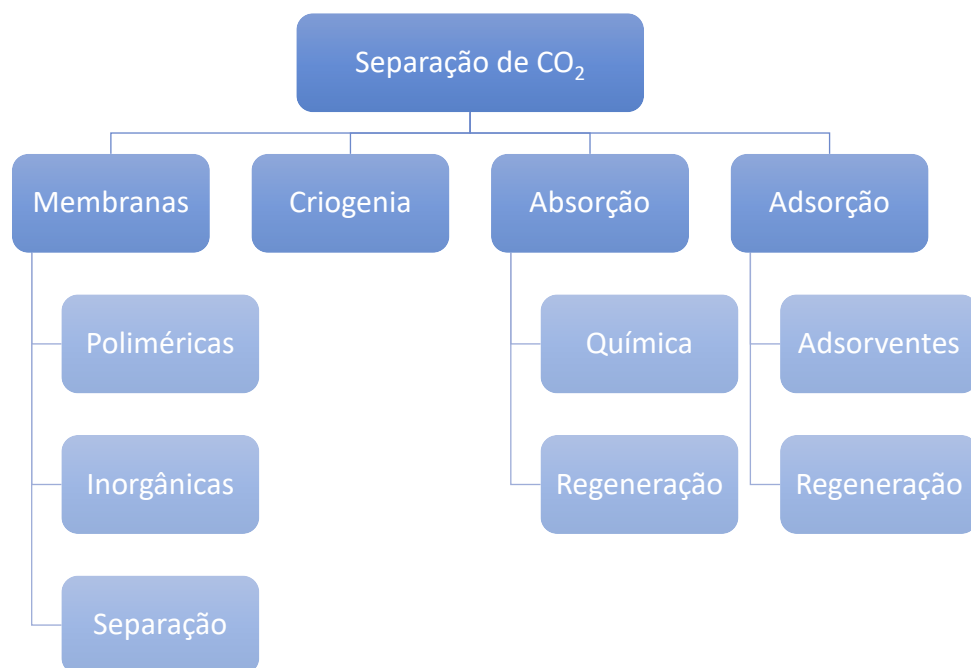


Figura 1.4. Técnicas de separação de CO₂

O CO₂ é a fonte de carbono mais abundante e uma importante fonte de energia, no entanto a estabilidade da sua estrutura em conjunto com as duas propriedades relativamente não tóxicas, inertes e não inflamável¹¹, fazem com o que existam algumas dificuldades na sua conversão.

O dióxido de carbono é um gás quando se encontra a pressão e temperatura atmosféricas, no entanto, através de pressurização e aquecimento atinge um ponto crítico. Trata-se de um ponto máximo onde as fases líquida e de vapor podem coexistir em equilíbrio, numa substância pura. Neste ponto o CO₂ torna-se então num fluido supercrítico. Este tipo de fluídos tem propriedades físicas e químicas específicas muito diferentes dos solventes orgânicos convencionais, tendo por exemplo uma viscosidade semelhante a um gás e uma densidade idêntica à de um líquido.¹² Devido à sua alta compressibilidade na região supercrítica, as suas propriedades podem ser variadas através de pequenas alterações de temperatura e pressão. O uso destes fluídos abrange vários sectores da engenharia química, como a indústria dos polímeros ou farmacêutica.

O CO₂ supercrítico não é inflamável, tóxico ou poluente, e quando reutilizado não contribui para o aquecimento global, o que o torna um solvente verde.¹³ A sua utilização oferece inúmeras vantagens em diversas áreas, um exemplo disto passa pelo seu uso em processos de extração, onde é possível através da despressurização fracionar diferentes produtos e precipitá-los, obtendo compostos de elevada pureza.¹¹

1.3. Metanol

O metanol (CH₃OH) é o mais simples de todos os álcoois, é incolor, inflamável, polar e muito volátil. A sua descoberta ocorreu no final do século XVII¹⁴ e desde então tornou-se num composto bastante versátil, é um produto de partida significativo para diversos químicos valiosos podendo ser aplicado como combustível limpo ou como aditivo de combustível. Além disso, pode também ser utilizado como transportador de hidrogénio ou ser convertido em compostos aromáticos, etileno e propileno, bem como para outros produtos petroquímicos de valor que hoje em dia são extraídos do petróleo bruto.^{4,15} A sua principal aplicação a nível industrial neste momento, é em reações de desidrogenação para obtenção de formaldeído, impulsionada pela indústria da construção, uma vez que o formaldeído é usado principalmente para produzir adesivos para a fabricação de vários produtos de placas de construção, e na produção de MTBE (metil tert-butil éter) - um aditivo para a gasolina.^{14,16}

O metanol foi produzido pela primeira vez como um subproduto da produção de carvão, por destilação destrutiva de madeira, ficando conhecido como álcool de

madeira, sendo esta a sua única forma de obtenção durante alguns anos. Teve desta forma aplicação em termos de iluminação, culinária e aquecimento, mas foi substituído posteriormente por combustíveis mais baratos.

Atualmente o metanol é produzido essencialmente a partir de gás de síntese-syngas- (uma mistura de CO e H₂ com uma pequena quantidade de CO₂), usando uma fonte de gás natural, carvão ou biomassa.^{2,17} Este processo é altamente eficiente, no entanto, devido ao seu elevado custo de produção apenas é viável economicamente se for realizado em grande escala.¹⁷

O gráfico seguinte (Figura 1.5) refere o maior consumidor mundial de metanol atualmente, a China, com novos desenvolvimentos na indústria química a construção de novas unidades de metanol para olefinas (MTO) e de metanol para propileno (MTP), representando 75% do consumo representado pelo Nordeste da Ásia. Seguem-se o Norte da América e a Europa Ocidental.

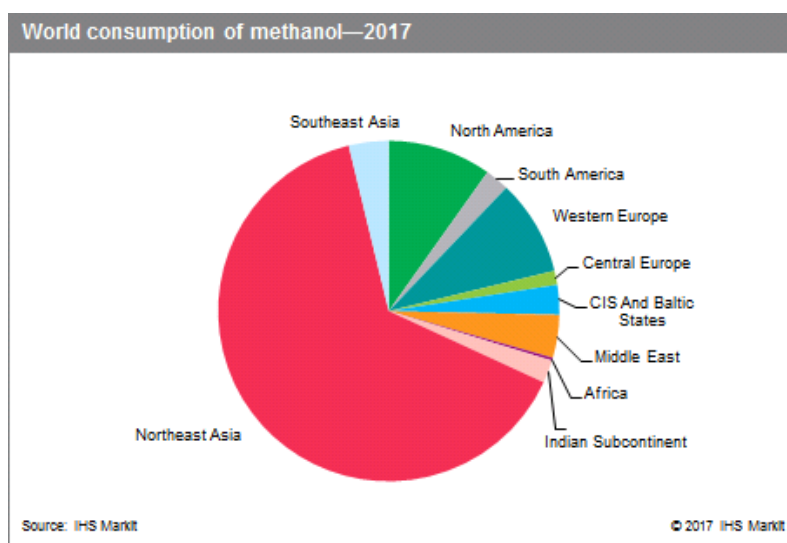


Figura 1.5. Consumo mundial de metanol¹⁵

No que diz respeito à toxicidade do metanol, se este for consumido ou inalado, quer de forma intencional ou acidental ou por exposição a fontes exógena pode ocorrer uma situação de envenenamento, uma vez que no organismo irá ocorrer a formação de formaldeído e ácido fórmico resultante da catálise do metanol por um álcool (catalisada pela enzima álcool desidrogenase, ADH) e pela enzima formaldeído desidrogenase (FaldDH) levando a uma disfunção do sistema nervoso, acidose metabólica, cegueira, instabilidade cardiovascular ou até mesmo morte.^{18,19,20} Este tipo de intoxicação pode

ocorrer, por exemplo, através de bebidas alcoólicas contaminadas, uma vez que o metanol é muito mais barato que o etanol, e é comum existirem bebidas adulteradas com metanol.

1.4. Conversão de CO₂ a metanol

A conversão catalítica de CO₂ para o metanol (CH₃OH) é considerada uma solução promissora para a diminuição dos gases com efeito estufa e para o esgotamento de combustíveis fósseis.⁴ O metanol pode ser sintetizado a partir de CO₂, por exemplo, através de diferentes tipos de catalisadores foto ou eletroquímicos, como complexos metálicos e semicondutores à base de óxidos.²¹

A utilização eficiente do CO₂ permite também a obtenção de outros novos produtos químicos e materiais, como por exemplo, combustíveis.

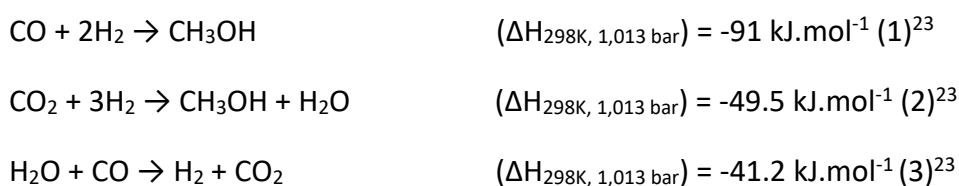
O dióxido de carbono pode ser convertido noutros compostos por diferentes processos, tais como:

- Catálise heterogénea e homogénea;^{22,5}
- Fotocatálise;^{22,5}
- Eletroquímica;²²
- Termoquímica;²²
- Catálise enzimática.²²

Em termos de eficiência energética e custo, a conversão eletroquímica torna-se mais vantajosa por diversas razões: os produtos obtidos a partir de síntese química ou armazenamento de energia podem ser aplicados aos combustíveis para transportes; o processo de conversão é preciso e facilmente controlável; os sistemas de conversão eletroquímicos são modulares e altamente eficientes; a eletricidade utilizada no processo pode ser obtida a partir de fontes de energia limpas como a energia solar, eólica, nuclear ou geotérmica, entre outras.²²

O processo tradicional de síntese de metanol através da hidrogenação tem sido tema contínuo de estudo nos últimos 15 anos, devido ao seu impacto ambiental. O uso de CO₂ como substituto do CO na produção de metanol tem recebido especial atenção, no entanto, estudos recentes mostraram que uma mistura com determinada proporção de CO₂ e CO aumenta o rendimento e diminui a energia de ativação da reação. As

reações consistem na hidrogenação de monóxido e dióxido de carbono (Eq. 1 e 2, respectivamente) seguindo-se a reação de mudança “água-gás” (Eq. 3). Trata-se de processo exotérmico, como é possível verificar pelos valores negativos de entalpia. Assim, um aumento de pressão e uma diminuição de temperatura devem favorecer a reação do ponto de vista termodinâmico. Por outro lado, tendo em conta a natureza quimicamente inerte do CO₂ um aumento da temperatura de reação promove a ativação do CO₂ e consequentemente a formação de metanol.⁴



Este trabalho foca-se na conversão biocatalítica de CO₂ em metanol, oferecendo uma abordagem mais sustentável que permite superar as barreiras termodinâmicas sem recorrer ao uso de temperaturas elevadas.

A primeira abordagem enzimática deste processo foi desenvolvida por Kuwabata e Yoneyama *et al.*^{24,25} que sintetizaram electroquimicamente metanol a partir de CO₂, utilizando metil de viologénio (MV²⁺) e pirroloquinolinaquinona (PQQ) como mediadores de eletrões e duas enzimas, formato desidrogenase (FDH) e metanol desidrogenase (MDH), como biocatalisadores.²⁴

Posteriormente, diversos autores provaram o funcionamento de um sistema multienzimático que catalisa a conversão enzimática de CO₂ em metanol. A reação conta com três enzimas formato desidrogenase (FateDH), formaldeído desidrogenase (FaldDH) e álcool desidrogenase (ADH), na presença de um dador de eletrões dinucleótido de adenina de β-nicotinamida, NADH.^{25,21,26}

1.4.1. Conversão Enzimática de CO₂ a metanol

Em comparação com outros processos químicos a conversão enzimática de CO₂ proporciona uma solução eficiente devido à especificidade e seletividade das enzimas.²² A redução de CO₂ pode ser catalisada por três oxidoredutases: formato (FateDH),

formaldeído (FaldDH) e álcool desidrogenases (ADH) (Figura 1.6). Estas reações dependem de um co-fator, β -nicotiamida adenina dinucleotido, na sua forma reduzida, NADH.

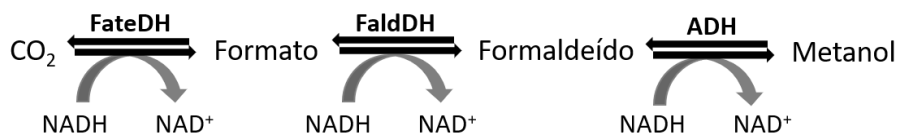


Figura 1.6. Conversão enzimática de CO₂ a metanol

Por cada mole de metanol produzida são consumidas três moles de co-fator, NADH. O elevado custo deste co-fator pode dificultar a aplicação deste sistema em processos industriais, mas a sua regeneração pode ser também considerada. No entanto, esta tem sido uma estratégia amplamente estudada e comprovada para a conversão de CO₂ num produto de interesse, como é o caso metanol. Em 1999, Obert e Dave²⁶ conseguiram a redução de CO₂ em metanol com a cascata multienzimática (FateDH, FaldDH e ADH) em meio aquoso, usando NADH como dador de eletrões e imobilizando o sistema numa matriz de sol-gel. Recentemente, em 2006, Amao e Watanabe²⁷ mostraram que a redução enzimática também pode ser feita através da regeneração fotoquímica de NADH, a partir de formaldeído catalisado pela enzima ADH ou utilizando bicarbonado (HCO₃⁻) como reagente para a produção de metanol, catalisado pelas enzimas FateDH, aldeído desidrogenase (AldDH) e ADH.

Assim, a conversão de CO₂ em metanol através de um sistema multienzimático tem sido reconhecida como um processo promissor existindo por um lado uma reciclagem de CO₂ e por outro a produção de produtos de interesse, de um modo mais sustentável. Em comparação com outros processos que usam apenas uma enzima, o metanol produzido a partir de uma reação multienzimática tem uma maior capacidade energética e o seu transporte é mais fácil.²⁸

Deste modo, o presente trabalho, consistiu no estudo de um sistema biocatalítico que utiliza o dióxido de carbono para a produção de metanol, imobilizando as enzimas numa matriz polimérica produzida pela técnica de eletrospinning.

1.5. Biocatálise

A utilização de processos catalíticos vai de encontro a um dos princípios da Química Verde. Catálise consiste na utilização de um catalisador para acelerar uma reação química diminuindo a energia de ativação necessária para que a reação ocorra. O catalisador forma uma ligação química com as moléculas sem interferir na reação permitindo o aumento da velocidade da reação.

Na biocatálise são utilizados catalisadores naturais, como enzimas ou microrganismos em processos fermentativos, que exibem atividades catalíticas de interesse para diversas aplicações como biossensores, produção de fármacos, indústria alimentar ou na produção biocombustíveis. As enzimas são catalisadores sustentáveis, derivam de recursos naturais, são biocompatíveis e biodegradáveis, não são tóxicos nem perigosos.²⁹ Apresentam ainda vantagens como elevado poder catalítico, possível utilização em solventes orgânicos, possibilidade de imobilização, regio-, quimio- e enantio-seletividade. Apesar de terem uma atividade ótima em condições normais (temperatura, pressão e pH), isso pode tornar-se num obstáculo para certas reações que exijam parâmetros específicos. Em termos de desvantagens apresentam limitações devido a certos inibidores e a sua reutilização nem sempre é fácil.³⁰ Deste modo são uma alternativa inovadora, económica e ecológica em relação à tradicional catálise heterogênea tradicional.³¹

As várias enzimas usadas em biocatálise encontram-se divididas em seis classes, representadas na Tabela 1.2.

Tabela 1.2. Classificação de enzimas pelo tipo de reação química que catalisam³²

Tipo de reação que catalisam	Tipo de enzima	Classificação
Oxidação – redução	Oxidoreductase	EC1
Transferência de grupos funcionais	Transferases	EC2
Hidrólise	Hidrolases	EC3
Adição e eliminação	Lipases	EC4
Isomeração	Isomerases	EC5
Formação de ligação de carbono	Ligases	EC6

Na bioconversão de CO₂ em metanol são utilizadas enzimas do grupo das oxidoredutases, também conhecidas com desidrogenases ou oxidases, e catalisam a transferência de eletrões de uma molécula (reductor) para a outra (oxidante).

1.5.1. Oxidoredutases

As enzimas da família das oxidoredutases catalisam a transferência de electrões de uma molécula (a redutora ou dadora de eletrões) para outra molécula (a oxidante ou aceitadora de eletrões). Estima-se que cerca de 25% das enzimas conhecidas sejam oxidoreductases. Durante a reação redox, este tipo de enzimas requerem a presença de espécies como nicotinamida adenina dinucleótido (NADH/NAD⁺) ou nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH/NADP⁺), que atuam como co-factores essenciais para o transporte dos eletrões.²⁸ Esta co-dependência leva a que seja necessário o uso de um processo de regeneração do co-factor, de modo a tornar o processo enzimático reutilizável e com um custo eficiente.³²

Em seguida descrevem-se algumas das características de uma das enzimas que fazem parte deste processo biocatalítico de conversão de CO₂ a metanol.

1.5.2. ADH

A álcool desidrogenase (ADH) é a última enzima utilizada no sistema biocatalítico em estudo (Figura 1.6). Trata-se de uma isoenzima que catalisa a interconversão entre álcoois primários e secundários a aldeídos ou cetonas. Em seres humanos e muitos outros animais, a ADH quebra álcoois que são tóxicos para o organismo e participam ainda na geração de grupos úteis de aldeídos, cetonas ou grupos de álcoois durante a biossíntese de vários metabolitos. No caso das plantas, leveduras e algumas bactérias esta enzima catalisa uma reação importante na fermentação.³³ É possível identificarem-se quatro grupos divergentes de ADHs que apresentam algumas variações, por exemplo na sua estrutura ou no tipo de reação catalítica, sendo eles: vertebrados, plantas, eucariontes e procariontes.^{33,34} Podem apresentar forma dimérica, no caso dos eucariontes superiores (plantas e animais), ou tetraméricas em procariontes ou eucariontes inferiores (leveduras).³⁵

A ADH é classificada como EC 1.1.1.1 pelo sistema de classificação de enzimas. Esta oxidoreductase está presente em praticamente todos os organismos. No presente estudo esta enzima irá ser utilizada para catalisar a reação reversível de oxidação do formaldeído em metanol na presença de um co-fator, NADH/NAD⁺.³⁵

A ADH usada neste trabalho é proveniente da levedura, *Saccharomyces Cerevisiae*, também denominada por YADH e tem três isoenzimas: YADH1, YADH2 e YADH3. Este tipo de isoenzima foi uma das primeiras a ser isolada e purificada.³⁴

Apesar do sistema biocatalítico acima referido apresentar um conjunto de três reações com três enzimas, este trabalho foca-se apenas na última reação. Trata-se de um sistema complexo que tem de ser analisado parte a parte. Assim, irá ser analisada a atividade da enzima ADH quando encapsulada numa membrana de fibras.

1.6. Imobilização de enzimas

As enzimas são consideradas biocatalisadores versáteis com propriedades tais como alta atividade, seletividade e especificidade, que permitem a realização de processos químicos complexos, com condições experimentais e ambientais mais sustentáveis. A sua aplicação tem crescido em diversas áreas, como a biomedicina, indústria ou engenharia química.³⁶ No entanto, muitas vezes a aplicação deste tipo de biocatalisador é dificultada pela falta de estabilidade em certas condições e pelas dificuldades de recuperação e reutilização.³⁷ É neste sentido que a imobilização de enzimas aparece como alternativa para superar estas e outras complexidades no uso deste tipo de biocatalisadores.

A imobilização enzimática tem como principal objetivo a maximização da eficiência catalítica e da vida útil das enzimas, permitindo uma melhoria da sua estabilidade a diferentes temperaturas, solventes, pH e presença de contaminantes e impurezas. O processo de imobilização possibilita também a recuperação e reutilização de enzimas, aumentando assim a sua produtividade como biocatalisador, melhorando as suas características e tornando-os catalisadores economicamente viáveis.^{38,39} Para que seja possível uma reutilização enzimática é necessário que a enzima seja bastante estável ou que seja estabilizada durante o processo de imobilização.³⁶ A preservação da estrutura terciária e do centro ativo das enzimas são fatores essenciais para maximizar

a sua estabilidade e a reatividade. Porém, a maioria dos métodos de imobilização causam modificações estruturais, físicas e químicas que diminuem a atividade catalítica de enzimas imobilizadas quando comparadas com a atividade de enzimas livres.^{38,40}

É necessário ter em consideração três fatores fundamentais para a imobilização de enzimas: a escolha da matriz de imobilização, as condições e os métodos de imobilização.

As matrizes podem ser classificadas como orgânicas ou inorgânicas, e de acordo com a sua composição química podem ainda ser subdivididas em polímeros naturais ou sintéticos. Certos polímeros como amido, colagénio, resinas de permuta iônica, sílicas, argilas, agarose ou celite são exemplos de matrizes mais utilizadas. A seleção da matriz ideal irá influenciar o processo de imobilização enzimática bem como o desempenho catalítico, uma vez que está diretamente em contato com a enzima. A interação entre a matriz de suporte e a enzima confere à enzima imobilizada propriedades mecânicas, químicas, bioquímicas e cinéticas específicas. A utilização de uma matriz de suporte adequada permitirá uma interação superficial entre a matriz de suporte e a enzima sem que existam alterações conformacionais que possam afetar o centro ativo ou a sua atividade em geral.⁴⁰ Embora não exista uma matriz apropriada para todo o tipo de enzimas e aplicações, devem ser tidas em conta as seguintes características para a escolha da matriz: ser hidrofílica, ter alta afinidade para proteínas, estabilidade mecânica, rigidez, viabilidade de regeneração, porosidade, não toxicidade e biodegradabilidade.³⁸

Recentes desenvolvimentos mostraram que é também possível a imobilização de enzimas em vários tipos e formas de materiais nanoestruturados, como nanopartículas, nanofibras ou nanotubos.⁴¹ Apesar de ser dispendioso, são excelentes materiais de suporte pois apresentam as características ideais para o processo de imobilização, contrabalançando os principais aspetos que determinam a eficiência de biocatalisadores. Por exemplo, as propriedades dos nanotubos de carbono conferem uma fácil separação ou reutilização do biocatalisador através de uma filtração simples ou usando um campo magnético.³⁸

A escolha do método de imobilização é também crucial, pois irá ter influência na atividade enzimática. Devem ser considerados fatores como as propriedades finais das enzimas imobilizadas, a toxicidade dos agentes de imobilização ou as características de

regeneração no processo de seleção do procedimento. Os métodos de imobilização podem ser divididos em duas classes: físicos ou químicos.

Os métodos físicos são caracterizados por interações mais fracas como ligações de hidrogénio, interações hidrofóbicas, forças de van der Waals, ligações por afinidade ou ligações iónicas da enzima com o material de suporte. Nos métodos químicos prevalecem as ligações covalentes entre a enzima e material de suporte, que poderão ser ligações éter, tio-éter, amidas ou carbamatos.

Existem quatro técnicas principais de imobilização de enzimas, adsorção, ligação covalente, encapsulação e reticulação.

O método de adsorção física pode ser definido como um dos métodos diretos de imobilização reversível, onde as enzimas podem ser adsorvidas fisicamente ou formam ligações com o material de suporte. A adsorção física requer geralmente a imersão do suporte numa solução de enzima e um tempo de incubação, ocorre através de interações fracas como forças de Van der Waals, interações hidrofóbicas ou pontes de hidrogénios. As ligações iónicas ocorrem através de pontes salinas e baseiam-se nos princípios de interações proteína-ligando.⁴²

A ligação covalente é uma das mais utilizadas no caso da imobilização irreversível de enzimas. Pode ser necessária ou não uma modificação no suporte para a sua ativação. A ligação envolve geralmente vários resíduos da enzima, proporcionando um aumento de rigidez na sua estrutura. Esta rigidez permite manter a estrutura da enzima inalterada perante agentes desnaturantes, como temperatura, pH extremos ou solventes orgânicos. A atividade da enzima ligada covalentemente irá depender do tamanho, forma e composição do material de suporte e das condições específicas de ligação. Alguns autores mostraram existe uma maior atividade enzimática quando os aminoácidos do centro ativo não envolvidos na ligação ao suporte.^{38,42}

A reticulação (cross-linking) é outro método de imobilização enzimática irreversível. Neste método não são utilizados suportes, a enzima é devidamente preparada e são usados diferentes agentes de reticulação de acordo com a sua finalidade. O processo de reticulação é conseguido pela formação de reticulações intermoleculares entre a enzima e o agente de reticulação. O reagente de reticulação mais utilizado é o glutaraldeído por ser económico e facilmente obtido em grandes quantidades. Na preparação enzimática a enzima é geralmente solubilizada e de seguida

poderá ser realizado um dos seguintes processos: cristalização, agregação, atomização ou reticulação direta. A Figura 1.7 mostra as diferentes abordagens e os seus resultados.

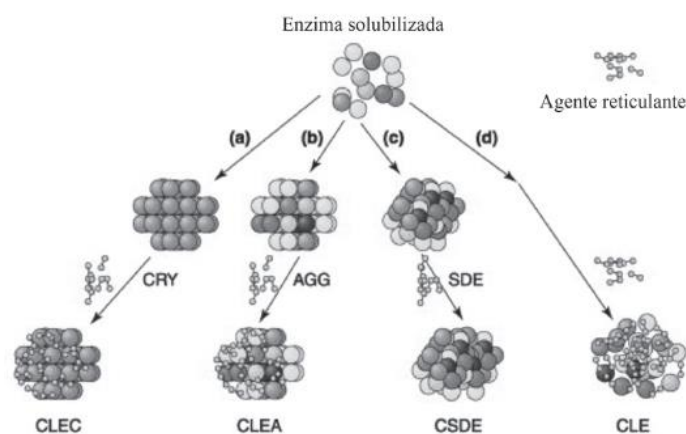


Figura 1.7. Diferentes abordagens para a obtenção de enzimas imobilizadas sem suporte: (a) cristalização; (b) agregação; (c) secagem por atomização; e (d) reticulação direta. CRY, cristais de enzima; AGG, agregados enzimáticos; SDE: enzima atomizada; CLECs, cristais de enzima reticulados; CLEAs, agregados enzimáticos reticulados; CSDEs, enzimas atomizadas reticuladas; CLEs, enzimas solubilizadas reticuladas. Adaptado de ⁴²

Por último, o método de encapsulação é baseado na inclusão das enzimas em estruturas poliméricas com um determinado tamanho de poros que permite a difusão dos substratos e dos produtos, mas que bloqueia a passagem da enzima. Nesse processo, a enzima é incorporada como parte da mistura a ser polimerizada. À medida que a polimerização ocorre, a matriz polimérica forma-se em torno da enzima, confinando-a na sua estrutura. Como não existe uma ligação entre a enzima e o suporte, não existe perda de atividade devido à inativação ou distorção do centro ativo.⁴²

Como matriz podem ser utilizados materiais produzidos pela técnica sol-gel ou diferentes tipos de polímeros, como alginato, álcool polivinílico (PVA), poliacrilamida, colagénio, gelatina, entre outros. O encapsulamento com suportes nanoestruturados, como fibras produzidas com por electrospinning, tem revolucionado o mundo da imobilização, com aplicações desde a química fina aos biossensores ou biocombustíveis.^{38,43}

A Tabela 1.3 apresenta as vantagens e desvantagens de cada método de imobilização acima descritos.

Tabela 1.3. Vantagens e desvantagens dos métodos de imobilização enzimática

	Vantagens	Desvantagens
Adsorção	<ul style="list-style-type: none"> - Simplicidade - Baixo custo - Desnecessidade de ativação do suporte - Possibilidade de reutilização do suporte - Não provoca alteração na estrutura conformacional da enzima (imobilização de acordo com a orientação favorável à enzima) 	<ul style="list-style-type: none"> - Aleatoriedade da interação enzima-suporte - Possibilidade de dessorção da enzima (devido a variações de temperatura, pH e força iônica)
Ligação covalente	<ul style="list-style-type: none"> - Resistência na presença de agentes desnaturantes - Enzima não é dessorvida do suporte 	<ul style="list-style-type: none"> - Redução da atividade catalítica da enzima devido à modificação da sua conformação natural
Reticulação	<ul style="list-style-type: none"> - Atividade enzimática altamente concentrada no catalisador - Estabilidade elevada - Baixos custos de produção 	<ul style="list-style-type: none"> - Agentes de reticulação podem desnaturar ou modificar estruturalmente a enzima
Encapsulamento	<ul style="list-style-type: none"> - Melhoria da estabilidade mecânica - Minimiza a lixiviação enzimática - Enzima não interage quimicamente com o polímero) - Escolha do material de encapsulação permite a criação de um microambiente ideal para a enzima 	<ul style="list-style-type: none"> - Limitações na transferência de massa - Retenção enzimática difícil (dependente da porosidade) - A enzima pode apresentar a desativação por alterações conformacionais

O encapsulamento de enzimas em géis ou fibras é um método conveniente para processos que envolvam substratos de baixo peso molecular. O uso de nanofibras de polímeros permite encapsular uma elevada carga de enzima e uma melhor eficiência catalítica para operações em larga escala. Quando comparadas com outros suportes nanoestruturados (por exemplo, materiais mesoporosos ou nanopartículas) as

nanofibras tem uma maior área de superfície que pode fornecer uma quantidade relativamente alta de carga de enzima e a sua porosidade permite uma maior acessibilidade aos locais ativos e uma baixa resistência à difusão necessária para uma elevada taxa de reação e conversão.³⁶

1.7. Electrospinning

O electrospinning é uma técnica que permite a formação de fibras de diâmetros à escala sub-micrométrica e nanométrica, através de forças de um campo electrostático.⁴⁴

A montagem laboratorial típica de electrospinning é constituída essencialmente por três componentes: uma fonte de alta tensão, uma agulha metálica e um coletor (Figura 1.8).⁴⁵

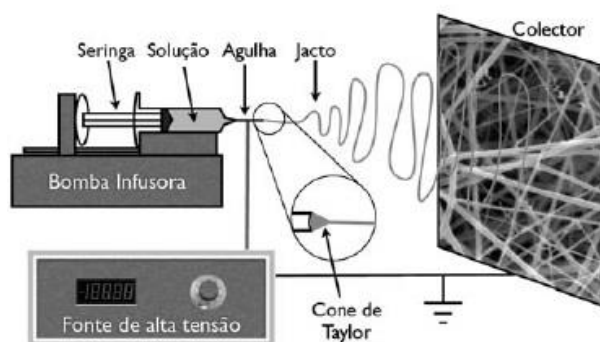


Figura 1.8. Montagem laboratorial de electrospinning

Esta técnica envolve a aplicação de alta tensão (normalmente entre 1 a 30 kV) a uma agulha metálica que está ligada a uma seringa, estando o coletor ligado à terra. A seringa é carregada com um líquido com elevada viscosidade, nomeadamente soluções poliméricas, colocada numa bomba infusora que permite o bombeamento da solução a uma velocidade constante e controlada. A solução polimérica na ponta da agulha assume a forma de uma gota esférica que fica carregada positivamente quando é aplicado o campo elétrico. Quando as forças electrostáticas, criadas pela repulsão entre si das cargas positivas, superam a tensão superficial do fluido ocorre uma deformação da gota numa forma cónica conhecida como cone de Taylor.^{45,40} É a partir do cone de Taylor que o fluido é ejetado em direção ao coletor. Este jato é estirado

durante a sua viagem até ao coletor dando-se, simultaneamente a evaporação do solvente.⁴⁰

As fibras resultantes de tipo de técnica têm uma relação área/volume elevada e podem ter diferentes diâmetros (Figura 1.9) segundo a finalidade desejada, tornando-as deste modo potenciais candidatas para uma variedade de campos como tecnologias de membrana, sistema de entrega de fármacos, imobilização de enzimas, eletrónica ou sensores.⁴⁴

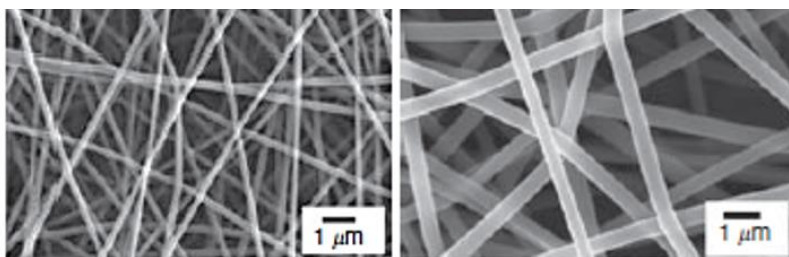


Figura 1.9. Imagens SEM de fibras de PVA com diferentes diâmetros⁴⁶

Esta técnica pode também ser utilizada na imobilização de enzimas. A enzima é dissolvida na solução polimérica, ficando encapsulada nas fibras após o processo de eletrospinning.⁴⁰ A principal vantagem do uso deste tipo de fibras para a imobilização de enzimas, está relacionada essencialmente com o facto do tamanho das fibras ser ajustável (que poderá ir de micro a nanométrico), bem como a sua morfologia e composição.

Parâmetros do electrospinning

O sucesso na obtenção de fibras através do processo de electrospinning depende de alguns parâmetros. É possível dividi-los em três grupos relacionados com a solução, o processo e o ambiente envolvente.⁴⁷

Nos parâmetros da solução, devem ser tomados em atenção a concentração, o peso molecular do polímero, a viscosidade, tensão superficial e condutividade.

Uma solução pouco concentrada pode dar origem a um processo de deposição de gotas denominada de electrospray, devido à baixa viscosidade associada e à elevada tensão superficial.⁴⁸ Se a concentração for muito elevada pode não se conseguir obter fibras. É, portanto, necessário encontrar uma concentração certa que seja favorável ao processo. O peso molecular está relacionado com o enrolamento das cadeias do

polímero em solução, tendo por isso influência na viscosidade da solução e, consequentemente, na morfologia das fibras formadas.⁴⁷

A tensão superficial relaciona-se com a formação do cone de Taylor, a diminuição da tensão pode favorecer a formação de fibras sem defeitos. Quando a tensão aplicada é suficientemente alta, as forças electrostáticas superam a tensão superficial da gota formando-se o cone de Taylor e dando origem à fibra, quanto menor for o valor da tensão superficial menores serão as forças necessárias para superar essa tensão; logo menor é a tensão necessária para que se inicie o processo de fiação.⁴⁹

A condutividade de uma solução é determinada pelo tipo de polímero, solvente e pela presença de aditivos (ex. sais, tais como o KH_2PO_4 ou o NaCl , entre outros). O aumento da condutividade favorece a formação de fibras mais finas. Contudo, se a condutividade da solução for muito elevada pode-se ter electrospray ou, no limite, nem se conseguir obter fibras.⁴⁷

Nos parâmetros do processo é necessário ter em conta essencialmente a tensão aplicada, o caudal, o coletor e a distância entre o coletor e a agulha.⁴⁷

A tensão aplicada poderá influenciar o diâmetro da fibra dependendo do polímero que é utilizado. Esta variação está também relacionada com a concentração da solução de polímero e a distância entre o coletor e a seringa. O caudal influencia a quantidade de solução presente na ponta da agulha e, portanto, o diâmetro das fibras obtidas: para o mesmo campo elétrico aplicado, o diâmetro das fibras é tanto maior quanto maior for o caudal da solução.⁴⁷ A distância entre o coletor e a seringa está também relacionada com o campo elétrico sendo que um aumento ou uma diminuição desta distância influencia a formação do jato e o diâmetro da fibra.⁴⁹

No que diz respeito aos parâmetros ambientais salientam-se a temperatura e a humidade. Uma temperatura elevada e uma baixa humidade aumenta a velocidade de evaporação do solvente, conduzindo, regra geral, a fibras de menor diâmetro.^{47,49} Por outro lado, uma humidade demasiado alta pode levar ao aumento do diâmetro das fibras resultantes, por dificultar a evaporação do solvente e influenciar a distribuição das cargas à superfície do jato.⁴⁷

Capítulo 2

Materiais e Métodos

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O objetivo principal deste trabalho é estudar a atividade enzimática da enzima ADH quando imobilizada em fibras produzidas por electrospinning. A enzima foi imobilizada numa fibra de PVA. O método de Lowry foi utilizado para determinar a eficiência da imobilização. A eficiência da reação foi determinada por um método colorimétrico e pela quantificação da conversão de NAD^+ através de espectroscopia de UV/Vis. Executaram-se vários testes de caracterização das fibras obtidas e das soluções utilizadas.

2.1. Electrospinning

2.1.1. Químicos/Materiais

O polímero utilizado foi o álcool polivinílico (PVA; Sigma-Aldrich, 95% hidrolisado, MW 95000). A enzima adicionada foi a álcool desidrogenase (ADH) proveniente da *Saccharomyces cerevisiae* (358 U/mg sólida), adquirida na Sigma-Aldrich.

2.1.2. Preparação das soluções

Foram preparadas soluções de PVA com concentrações de 7%, 8%, 9%, 9,5%, e 10%. Para cada uma das soluções dissolveu-se a quantidade correspondente a cada concentração em água destilada a uma temperatura de 80°C (por ser a sua temperatura de transição vítrea) sob agitação. Nas soluções contendo enzima, foram adicionados 100 μL de uma solução previamente preparada de ADH em tampão salino tris, com uma concentração de 10 mg/mL. O tampão salino foi preparado a partir das seguintes soluções: solução tampão salina tris (TBS – Tris-HCl 0,05 M, NaCl 0,15 M a pH 7,6) preparada com Trizma® ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$) (99,5%, Riedel-de Haën), ácido clorídrico (HCl) (36,5-38%, Scharlau) e cloreto de sódio (NaCl) (99,5%, Panreac); tampão fosfato salino (PBS pH 7,4) preparado com cloreto de sódio (NaCl) (99,5%, Pancreac), cloreto de potássio (KCl) (99%, Sigma), Fosfato de sódio dibásico (98-101%, Scharlau), Fosfato de potássio monobásico (99,5%, Merck) ; tampão pirofosfato de sódio (50 mM, pH 8,5) preparado

com pirofosfato de sódio ($\text{Na}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$) (Sigma) e o pH foi medido com um medidor de pH metro Básico 20 + da marca Crison.

2.1.3. Instalação de Electrospinning

A fonte de alta tensão utilizada foi uma Glassman EL 30 kV, ligada a uma agulha de metal. A seringa foi colocada numa bomba KDS100 da KD Scientific. Foram testadas agulhas da marca ITEC com diferentes diâmetros (0,84 mm/20G, 0,41 mm/23G e 0,25 mm/27G). As fibras obtidas foram recolhidas num coletor fixo. Estes equipamentos estão dentro de uma caixa acrílica de forma a controlar os parâmetros ambientais. Para o controlo da humidade, recorreu-se ao ar condicionado existente na sala e a um desumidificador. Quando necessário usou-se um secador para aumentar a temperatura.

2.1.4. Condições de electrospinning

Para a produção de fibras é necessário a otimização das condições de trabalho para a obtenção do melhor resultado possível. A Tabela 2.1 refere-se aos vários parâmetros testados como a temperatura e humidade dentro do sistema, a distância entre o coletor e a agulha, o caudal e voltagem utilizados.

Tabela 2.1. Parâmetros testados

w/v		Temperatura (°C)	Humidade (%)	Caudal (ml/h)	Distância (cm)	Voltagem (kV)
PVA	7%	20-28	35-50	0,2	15-16	16-20
	8%					
	9%					
	9,5%					
	10%					
PVA + ADH	7%	23-28	40-50	0,2	15-16	16-20
	8%					
	9,5%					
	10%					
	9,5%					

2.2. Métodos de caracterização

2.2.1. Caracterização Reológica

Os testes reológicos permitiram a obtenção de informação a cerca da viscosidade das soluções usadas no processo de electrospinning.

O parâmetro da viscosidade é importante para a caracterização das soluções utilizadas, pois tem influência na formação das fibras obtidas pela técnica de electrospinning.

É possível dividir os líquidos ou fluídos em duas categorias: Newtonianos e não-Newtonianos. Um fluido Newtoniano caracteriza-se pela sua viscosidade constante qualquer que seja a taxa de cisalhamento aplicada. Pelo contrário, um fluido não-Newtoniano não apresenta uma viscosidade constante, podendo ser ainda ser separado em duas categorias: reofluídificantes, se a sua viscosidade diminuir com a taxa de corte ou reoespessantes e a viscosidade aumentar.^{52,53}

Os testes de viscosidade foram realizados com a colaboração do CENIMAT num reómetro da marca Malvern Bohlin Gemini HR Nano. Foram obtidas curvas de fluxo (viscosidade vs. Taxa de corte) usando uma geometria de pratos paralelos de forma a garantir o estado estacionário, todas as soluções foram submetidas a um pré-shear antes da medição propriamente dita.

2.2.2. Caracterização Mecânica

Para determinar a resistência mecânica das matrizes produzidas foram realizados ensaios de tração uniaxial.

Estes ensaios permitem determinar o comportamento mecânico de uma amostra sob forças de tração axial. A análise deste comportamento é feita através da construção de curvas de tensão versus extensão (curvas de tração) que fornece parâmetros importantes, como por exemplo, a tensão de rutura, a extensão à rutura (ductilidade) e o Módulo de Young.

O módulo de Young é uma propriedade importante para a caracterização de materiais, sendo uma medida da sua rigidez elástica. A Figura 2.1 mostra um exemplo de uma curva de tração obtida para uma amostra de fibra de PVA, o módulo de Young

foi calculado pelo declive da curva na zona elástica⁵⁴ representado pela linha a azul. As curvas de tração estão divididas em dois regimes: A - zona elástica (as deformações não são permanentes, quando a carga é removida o corpo retorna ao seu formato original); B - zona plástica (as deformações são permanentes).

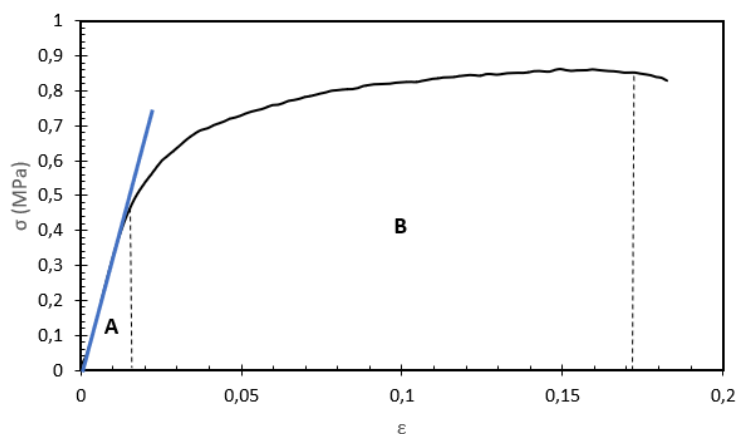


Figura 2.1. Exemplo de curva de tração obtida para uma amostra de fibras de PVA

Os ensaios foram realizados numa máquina de tração da marca Rheometric Scientific (Minimat Firmware 3.1) (Figura 2.2).

As matrizes apresentam alguma heterogeneidade macroscópica. Foram analisadas pelo menos 4 amostras de cada matriz. As fibras contendo apenas PVA 9,5% (w/v) utilizadas tinham cerca de 75 mm de largura e 0,6 mm de espessura. No caso das fibras contendo a enzima (ADH), as amostras testadas tinham cerca de 80 mm de largura e 0,5 mm de espessura. Efetuaram-se ensaios de tensão até à rutura das matrizes com uma velocidade de deslocamento de $1,5 \text{ mm.s}^{-1}$. A Figura 2.2 mostra a montagem experimental das fibras testadas.

Foram avaliados os valores de rigidez (módulo de Young), resistência à tração e ductilidade (deformação máxima na rutura) das matrizes testadas.

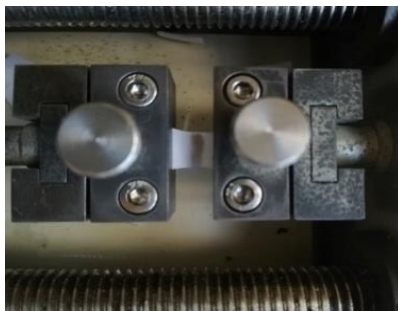


Figura 2.2. Montagem experimental da máquina de tração

2.2.3. Caracterização Química

2.2.3.1. *Espectroscopia de Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)*

A espectroscopia de infravermelho estuda a vibração dos átomos da molécula quando recebe uma radiação. O espectro de infravermelho obtém-se geralmente pela passagem da radiação de IV através da amostra e pela determinação da radiação incidente absorvida a uma determinada energia. Para que uma molécula apresente absorção na região do infravermelho é necessário que o seu momento dipolar sofra uma variação durante a vibração. A maioria dos compostos orgânicos e inorgânicos absorve a radiação entre os 4000 e 400 cm^{-1} .⁵⁵

A grande vantagem desta técnica é a sua capacidade de analisar uma grande diversidade de amostras quer sejam sólidas, líquidas ou gasosas. Para a obtenção de bons espectros é por vezes necessária uma preparação prévia da amostra.

Neste trabalho recorreu-se ao uso do FTIR-ATR, para uma análise direta das amostras, sem fosse necessária uma preparação prévia.

O ATR (Attenuated Total Reflectance) consiste no direcionamento do feixe de infravermelho para um cristal opticamente denso e com um elevado índice de refração num determinado ângulo. A reflexão interna ocorrida cria uma onda evanescente que se projeta ortogonalmente pela amostra. Parte da energia desta onda é absorvida pela amostra e a radiação refletida segue para o detetor que mede as alterações (atenuações) que ocorreram no feixe, gerando o espectro de infravermelho. Esta técnica permite não só contornar os processos de preparações de amostra como obter uma melhor resolução espectral.^{56,57}

Neste trabalho, os espectros foram obtidos num espectrofotómetro da marca Perkin Elmer – Spectrum Two, entre os comprimentos de onda 4000 e 400 cm^{-1} e apresentados como valores de transmitância.

2.2.4. Caracterização Morfológica

2.2.4.1. *Microscopia Eletrónica de Varrimento (SEM)*

A técnica de microscopia eletrónica de varrimento baseia-se no uso de um feixe de eletrões de elevada energia, que permite a obtenção de uma imagem 3D da amostra

em estudo, possibilitando desta forma uma análise da estrutura superficial de um objeto. Os elétrons acelerados possuem uma determinada energia cinética, que é dissipada quando entram em contacto com a amostra, originando diferentes sinais consoante o tipo de interações e criando assim uma réplica exata da amostra em estudo.

As interações podem ser elásticas ou inelásticas. Os sinais podem incluir elétrons secundários, elétrons retransmitidos, fótons (raios-X), luz visível (catodoluminescência) ou calor (Figura 2.3). Os elétrons secundários são responsáveis pela morfologia e topografia da amostra e os elétrons retransmitidos são úteis para demonstrar contrastes. Os raios-X gerados são úteis na análise elementar, permitem a identificação da composição de uma amostra. Normalmente a maioria da energia dissipada está sob a forma de calor.⁵⁰

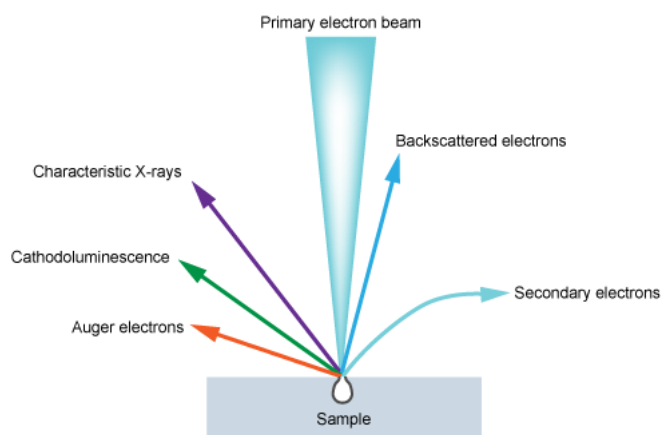


Figura 2.3. Diferentes sinais produzidos pela interação de um feixe de elétrons de alta energia e uma amostra. Adaptado de⁵⁰

Este tipo de microscópio opera em vácuo e está associado a um campo elétrico, devendo a amostra ter algum tipo de condutividade. Se a amostra não for naturalmente condutiva pode ser revestida com um material condutor, como por exemplo, ouro ou platina.⁵¹

Neste trabalho foi utilizada esta técnica para observar a morfologia das fibras obtidas, de modo a perceber quais as concentrações e condições mais adequadas para a obtenção de fibras com melhor morfologia.

As amostras estudadas, foram analisadas num aparelho DSM962 da Zeiss, e as microfotografias foram obtidas com diversas ampliações. Para a fixação da amostra

usou-se uma fita de carbono condutora da marca Agar Scientific. De modo a torna-las condutoras, as amostras foram recobertas com Ouro.

2.3. Estudos enzimáticos

Começou por se utilizar um método indireto para a deteção de acetaldeído/formaldeído, em que a redução de NAD^+ ($\geq 99\%$, Sigma-Aldrich) é seguida pela medição da absorvância a 340 nm. Isto foi possível porque o NADH absorve a 340 nm e a sua forma oxidada (NAD^+) não absorve a esse comprimento de onda (Figura 2.4).

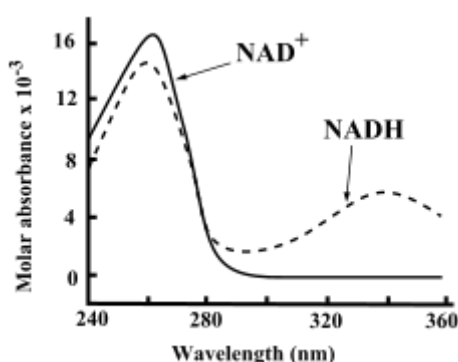


Figura 2.4. Espectro de absorção UV-vis de NAD^+ e NADH ⁶¹

A otimização das condições de trabalho foi necessária pois existem alguns cuidados a ter com as soluções da enzima ADH e de NAD^+ que devem ser tomados em consideração. O congelamento e descongelamento das soluções de enzima não é recomendado, devendo ser preparada no momento da sua utilização.⁶² Soluções neutras ou ligeiramente ácidas de NAD^+ são estáveis quando mantidas a 0°C durante um curto período de tempo. Soluções alcalinas, especialmente na presença de fosfato, maleato ou carbonato são muito labéis. As soluções de NAD^+ são também sensíveis à luz.⁶³ Deste modo, e assim que este fator foi tido em conta, a preparação destas soluções começou a ser feita apenas no momento da sua utilização. As soluções de enzima foram preparadas em tampão salino tris e as soluções de NAD^+ foram preparadas em água.

A atividade da enzima em estudo difere com o substrato utilizado, sendo maior em etanol (K_m (etanol) = 21 mM e K_m (metanol) = 130 mM)⁶². Por ser mais conveniente

estudou-se a reação de conversão de etanol seguindo-se a formação de acetaldeído a partir de etanol (Figura 2.5).

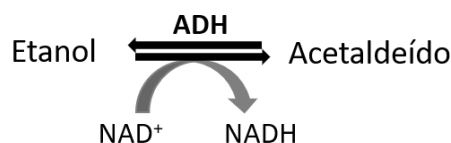


Figura 2.5. Reação de formação de acetaldeído a partir de etanol

Devido às limitações iniciais na obtenção de resultados, optou-se por seguir a reação de conversão de NAD^+ para NADH em paralelo com um método colorimétrico que permite a verificação da conversão de etanol em acetaldeído.

2.3.1. Método colorimétrico – Ensaio do MTT

Este método baseia-se na redução de sais de tetrazólio e é um método bastante utilizado em ensaios enzimáticos ou para medir a toxicidade de diferentes substâncias em culturas de células.⁶⁴

O etanol é convertido em acetaldeído pela enzima álcool desidrogenase (ADH), e o NADH formado transfere seu hidrogénio através do sistema de metossulfato de fenazina-3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5- difeniltetrazolim de brometo (PMS-MTT), produzindo um composto com uma cor violeta (MTT Formazan) que apresenta um pico de absorção a 570 nm (Figura 2.6).⁶⁴

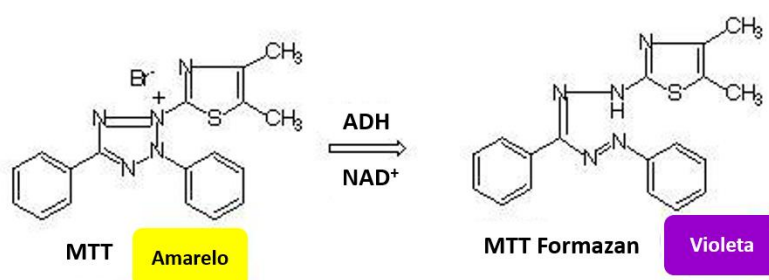


Figura 2.6. Reação MTT

Neste método, o etanol é usado como padrão para a curva de calibração. Foram utilizadas as seguintes soluções:

- Solução de MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide) 600 mM;

- Solução de PMS (*Phenazine Metholsulfate*) 100 mM;
- Solução tampão salina (PBS, pH 7,4);
- Solução tampão pirofosfato de sódio (50 mM, pH 8,5);
- Solução de NAD⁺ (2,5 mg/mL);
- Solução de ADH (1 mg/mL);
- Soluções de etanol a várias concentrações (0%, 0,01%, 0,02%, 0,03% (v/v)).

Para a curva de calibração colocaram-se 1,5 mL de etanol num eppendorf e adicionaram-se 100 µL de uma solução tampão pirofosfato de sódio, 100 µL de NAD⁺ e 100 µL de enzima ADH e agitou-se no vórtex. Após 5 minutos adicionaram-se 200 µL da solução de MTT (600 mM) e 50 µL da solução de PMS (100 mM) e agitou-se no vórtex novamente. Após 5 minutos mediu-se a absorvância de cada solução na região de UV-Vis a 340 nm e 570 nm contra o branco, este foi preparado de forma igual às soluções utilizadas, mas com 0% de etanol.

Esta curva de calibração permite-nos determinar a concentração máxima de álcool que a enzima em estudo consegue catalisar. Em seguida, prosseguiu-se para o estudo da atividade enzimática da enzima livre em solução e da enzima imobilizada numa fibra.

A leitura espectrofotométrica das soluções foi efetuada num aparelho da marca Thermo Electron Corporation – Hehios, e foram utilizadas cuvetes de quartzo.

2.3.2. Atividade Enzimática

2.3.2.1. *Medição da atividade da enzima livre em solução*

Através da curva de calibração verificou-se a concentração máxima que a enzima consegue catalisar, para garantir que os valores de atividade/absorvância estariam numa zona linear da reação, passou a utilizar-se uma concentração de etanol de 0,001%. Colocou-se num eppendorf 1,5 mL de uma solução de etanol (0,001%) e adicionaram-se 100 µL de uma solução tampão pirofosfato de sódio, 100 µL de NAD⁺ e 100 µL de enzima ADH e agitou-se no vórtex. Após 5 minutos adicionaram-se 200 µL da solução de MTT (600 mM) e 50 µL da solução de PMS (100 mM) e agitou-se no vórtex novamente. Após 5 minutos adicionaram-se 200 µL da solução de MTT (600 mM) e 50 µL da solução de PMS (100 mM) e agitou-se no vórtex novamente. Após 5 minutos seguiu-se a cinética

da reação durante 20 minutos medindo as absorvâncias da solução 340 nm e a 570 nm. O branco foi preparado de forma igual, mas com 0% de etanol.

Como se obtiveram resultados em ambos os comprimentos de onda, tentou-se novamente seguir a reação apenas através da conversão de NAD^+/NADH , para tal mantiveram-se todas as concentrações anteriormente usadas. Numa cuvete colocou-se 1,5 mL de uma solução de etanol (0,001%), adicionaram-se 100 μL de uma solução tampão pirofosfato de sódio, 100 μL de NAD^+ e 100 μL de enzima ADH e seguiu-se a cinética da reação a 340 nm durante 20 minutos. Este passou a ser o método usado nas seis réplicas feitas, que correspondem aos resultados apresentados.

2.3.2.2. Medição da atividade da enzima imobilizada na fibra

Devido à interferência causada pela fibra no feixe de UV-Vis (quando colocada na cuvete de quartzo), por não ser totalmente transparente e homogênea, o método acima descrito teve de ser adaptado. Foram utilizadas as mesmas concentrações que no ensaio acima descrito, mas colocou-se num copo 3 mL uma solução de etanol (0,001%), adicionaram-se 100 μL de uma solução tampão pirofosfato de sódio e 100 μL de NAD^+ . Mediram-se as absorvâncias da solução a 340 nm, em intervalos de tempo de 2 em 2 minutos, de uma alíquota de 500 μL da solução, voltando a colocar esse volume no copo de 3 mL após a leitura. O aumento do volume da reação de 1,5 para 3 mL deveu-se ao facto da fibra absorver parte da solução, e assim ser difícil ter volume para as medições de UV-Vis.

2.4. Imobilização enzimática

A imobilização enzimática foi feita pelo encapsulamento da enzima em estudo numa fibra de PVA produzida por eletrospinning. Preparou-se uma solução da enzima ADH em tampão salino tris, como uma concentração de 10 mg/mL. Adicionaram-se 100 μL desta solução a uma solução de PVA previamente preparada em água.

A eficiência da imobilização nas fibras foi determinada pelo método de Lowry modificado. Para tal, analisou-se o conteúdo de proteínas das soluções onde foram mergulhadas as fibras para a determinação da atividade enzimática.

2.5. Método de Lowry

É a metodologia mais utilizada para a determinação do conteúdo de proteína total, combinando a reação de Biureto com a oxidação de resíduos aromáticos.⁶⁵ Este método utiliza uma solução conhecida como reagente de Folin-Ciocalteu que se baseia na mistura de molibdato, tungstato e ácido fosfórico, que sofrem uma redução quando reage com proteínas na presença de um catalisador de cobre (II). A adição deste reagente a uma amostra, que contenha proteínas, reduz o complexo fosfomolibdato-fosfotungstato em heteropolimolibdênio resultando num aumento de cor azul, apresentando um pico de absorção a 750 nm.⁶⁵

Quanto mais intensa for a cor do produto final, maior será o teor de proteína. A intensidade de cor varia em função da proteína, aumentando com a presença de tirosina, triptofano, cisteína, histidina e asparagina, respetivamente.

Neste método é usado como padrão para a curva de calibração albumina de soro bovino (BSA) (ver Apêndice 1), devido a sua elevada pureza a baixo custo.

A maior vantagem deste método é a sua grande sensibilidade para proteínas, no entanto apresenta também algumas desvantagens como o seu longo tempo de análise, ter uma absorvidade específica e seguir a lei de Lambert-Beer apenas num pequeno intervalo de concentrações de proteínas.⁶⁶

Foram usadas as seguintes soluções:

- Solução A: 30g/L de Na_2CO_3 com 4 g/L de NaOH;
- Solução 2: Tártaro de potássio de sódio a 2% (w/v);
- Solução 3: Solução aquosa de sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) a 2% (w/v)
- Reagente de Lowry: Adição de 0,25 ml da solução 2 a 0,25 mL da solução 3 e perfazer a 25 mL com a solução A. Deverá ser adicionada primeiro a solução 2 para prevenir a precipitação;
- Reagente Folin-Ciocalteu (Merck) (diluição de 1:2);
- Solução Padrão BSA, 0,4 mg/mL.

Para este método, adicionaram-se 200 μL da amostra a 1 mL do reagente de Lowry agitando vigorosamente no vórtex. Após 10 minutos adicionaram-se 200 μL do reagente

de folin-ciocalteau e agitou-se vigorosamente no vórtex. Após 30 minutos, mediu-se a absorvância na região de UV-vis a 750 nm contra o branco, este foi preparado com 200 µL do tampão.

2.6. Perda de Massa

Foi avaliada a perda de massa das fibras após os ensaios enzimáticos. Para tal, pesaram-se as fibras antes dos testes enzimáticos e após os ensaios as fibras foram colocadas na estufa para secar, sendo novamente pesadas ao fim de 24 horas. A percentagem foi calculada pela seguinte razão:

$$\% \text{ Perda de massa} = \frac{\text{massa final} - \text{massa inicial}}{\text{massa inicial}} \times 100$$

Massa final – Peso da fibra seca 24 horas após o ensaio enzimático (mg)

Massa inicial – Peso inicial da fibra (mg)

Este teste permite perceber se existe alguma perda de massa da fibra durante os ensaios enzimáticos. Uma possível degradação da fibra poderá comprometer o seu funcionamento nos ensaios seguintes.

Capítulo 3

Resultados e discussão

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Electrospinning

3.1.1. Álcool polivinílico (PVA)

O álcool polivinílico é um polímero sintético hidrossolúvel, semicristalino e biocompatível obtido através da hidrólise do acetato polivinílico (PVAc) removendo os grupos acetato.^{46,67} Este polímero é produzido industrialmente e está disponível em diversas gamas de peso molecular e graus de hidrolisação.⁴⁶ Apesar de ser um polímero sintético é também biodegradável, essa característica associada à sua excelente resistência química e às suas propriedades físicas, mecânicas e biológicas permite a sua utilização em diversas áreas de investigação, desde implantes, filmes microbianos, lentes de contato até à libertação de fármacos.⁶⁸ Estudos recentes mostram a aplicabilidade deste polímero na área biomédica através da utilização de fibras produzidas por electrospinning.⁶⁷

3.1.2. Produção de fibras por electrospinning

No processo de obtenção de fibras é necessário ter em consideração não só todos os parâmetros anteriormente referidos sobre a técnica de electrospinning, mas também algumas propriedades dos polímeros que possam afetar o processo. No caso do PVA, este polímero é produzido com diferentes graus de hidrólise, esta característica irá afetar o polímero alterando as suas propriedades mecânicas, como por exemplo, a resistência à água e a sua dissolução. Para baixos graus de hidrólise este polímero apresenta uma fácil dissolução, no entanto tem uma resistência muito menor quando comparado com soluções com polímero de elevado grau de hidrólise.⁴⁶ Deste modo, para este trabalho foi utilizado um PVA em pó com um grau de hidrólise elevado.

Preparam-se várias soluções com diferentes concentrações, quer do polímero utilizado (PVA) como da enzima (ADH), para determinar quais as condições apropriadas à formação das melhores fibras.

Para determinar todos os parâmetros mais adequados para a formação de fibras foram realizados ensaios de caracterização, tanto das soluções como das fibras inicialmente obtidas.

As concentrações finais escolhidas foram 9,5% (w/v) para o PVA e 10 mg/mL para a enzima. Verificou-se que para temperaturas mais elevadas e baixos valores de humidade a formação da fibra ficava comprometida, ocorrendo um entupimento da agulha. Deste modo manteve-se a temperatura entre os 20-23°C (temperatura ambiente) e uma percentagem de humidade que não fosse inferior a 40%. Os valores testados para os parâmetros da distância e voltagem a utilizar, não apresentaram uma influência significativa.

A Tabela 3.1 refere os parâmetros ambientais e de processo utilizados. A agulha usada para todas as soluções era de calibre de 27G (0,21 mm).

Tabela 3.1. Parâmetros utilizados para a obtenção de membranas de fibras

	w/v	Temperatura (°C)	Humidade (%)	Caudal (ml/h)	Distância (cm)	Voltagem (kV)
PVA	9,5%	20-23	40-45	0,2	15	16
PVA + ADH	9,5% + (10 mg/mL)	20-23	40-45	0,2	15	16

As fibras foram recolhidas numa folha de papel de alumínio (Figura 3.1), a sua separação da folha foi feita com o auxílio de uma lâmina e guardada numa caixa de plástico. O processo de separação deve ser realizado imediatamente após o final da recolha, de forma a minimizar os danos que possam ocorrer. Deixar a fibra no coletor por muito tempo pode dificultar o processo de separação da fibra, devido à secagem de solventes residuais das fibras que levam a que fique agarrada à superfície do coletor.⁶⁹

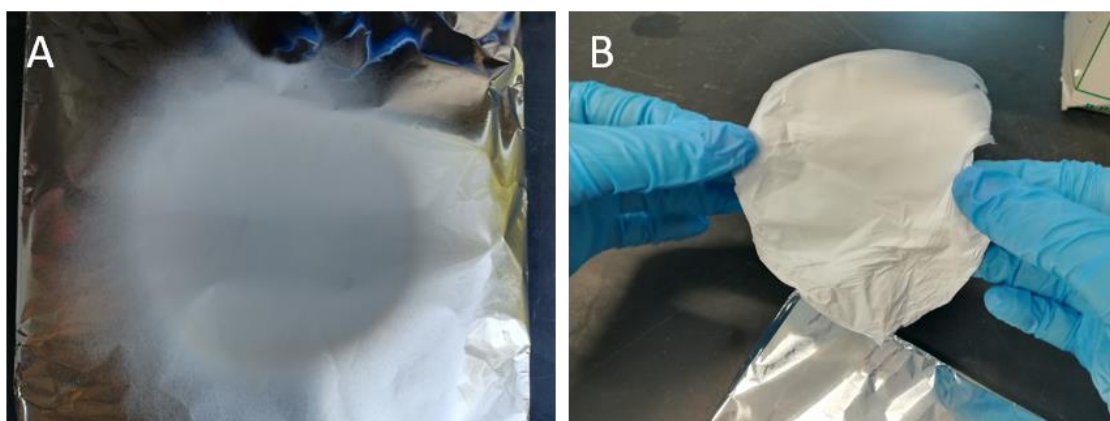


Figura 3.1. Aspetto das fibras obtidas. A – Após a recolha; B – Após a separação.

3.1.3. Caracterização Reológica

A viscosidade tem um papel importante na formação de fibras uniformes. A Figura 3.2 mostra as curvas de fluxo das soluções de PVA 9,5% (w/v) com e sem a adição da enzima ADH (10 mg/mL).

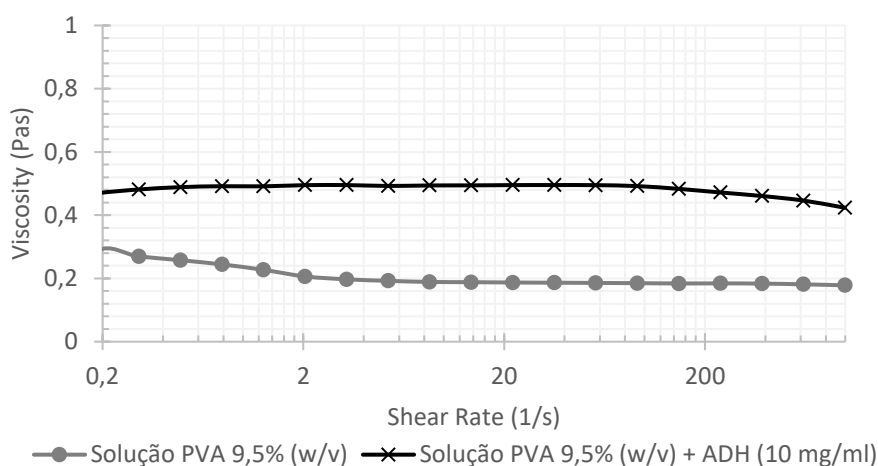


Figura 3.2. Gráfico de viscosidade das soluções de PVA 9,5% (w/v) e PVA 9,5% (w/v) + ADH (10 mg/ml)

A adição de enzima à solução provocou um ligeiro aumento na viscosidade (Tabela 3.2). Apesar de pouco significativo este aumento irá ter influência no diâmetro da fibra como será possível verificar nos testes seguintes de caracterização das fibras.

Tabela 3.2. Valores de viscosidade (Pa.s^{-1}) das soluções testadas

Solução PVA 9,5% (w/v)	Solução PVA 9,5% (w/v) + ADH (10 mg/ml)
0,287	0,469

Ambas as soluções apresentam um comportamento típico de um fluido newtoniano, para as gamas de taxas de corte estudadas.⁵²

3.1.4. Caracterização Mecânica

A realização dos ensaios de tração teve como principal objetivo avaliar o comportamento mecânico das fibras produzidas.

A Figura 3.3 mostra as curvas de tração obtidas para as amostras em estudo. As curvas a cinza dizem respeito às amostras de fibras de PVA e as amostras a preto correspondem às amostras de fibras de PVA com adição da enzima ADH.

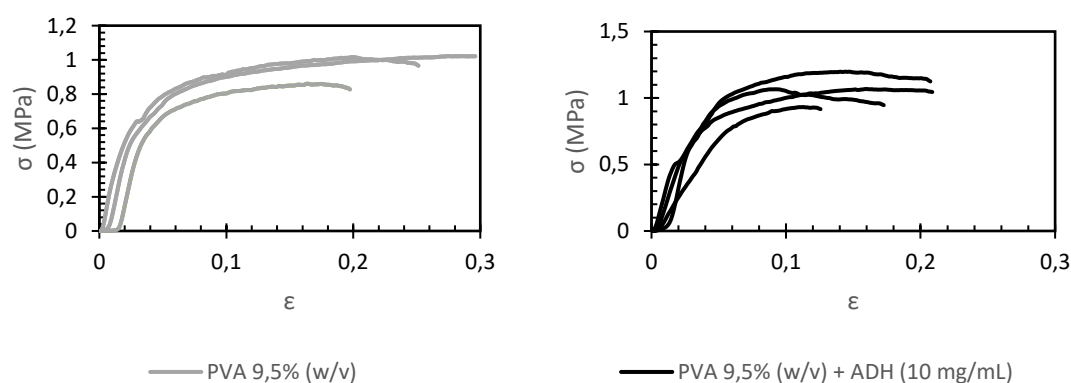


Figura 3.3. Curvas de tração obtidas para as fibras de PVA 9,5% (w/v) e de PVA 9,5% (w/v) com a enzima ADH (10 mg/mL)

A partir destas curvas calcularam-se os seguintes parâmetros: módulo de Young, tensão de rutura e ductilidade (Tabela 3.3).

Tabela 3.3. Resultados dos testes mecânicos

	Módulo de Young (MPa)	Tensão de Ruptura (MPa)	Ductilidade (%)
PVA 9,5% (w/v)	37,5±15	0,9±0,1	26,3±5,9
PVA 9,5% (w/v) + ADH (10 mg/ml)	30±8,2	1±0,1	17,9±3,4

Verifica-se uma diminuição do módulo de elasticidade (módulo de Young) com a adição da enzima, no entanto o erro associado é elevado, o que faz com que a diferença observada não seja estatisticamente significativa. As tensões de rutura de e a

ductilidade de um material são calculados no seu ponto de ruptura. Observa-se também que os valores em ambos os casos são bastante parecidos, não existindo um efeito significativo com a presença de enzima. Deste modo, verifica-se que a adição de enzima não tem uma influência significativa no comportamento mecânico das fibras obtidas.

3.1.5. Caracterização Química

3.1.5.1. FTIR-ATR

Através da análise por espectroscopia infravermelha, é possível saber a composição e quais os grupos químicos funcionais que existem na amostra analisada, cada um correspondendo a um pico que absorve a um comprimento de onda específico. Se houver uma alteração nesses grupos funcionais, como por exemplo uma alteração devida a interações com outros compostos, esses picos poderão ter a sua intensidade alterada podem sofrer desvios no comprimento de onda e pode também ocorrer o aparecimento ou desaparecimento de picos. Estas alterações no espectro de FTIR-ATR permitem assim determinar se existem interações entre os compostos em estudo.

Através da análise dos espectros obtidos (Figura 3.4) é possível verificar que a adição de enzima à solução de PVA não tem influência na composição química do polímero. Este resultado era esperado pois neste método de imobilização não existe interação química entre a enzima e o polímero. Todos os espectros apresentam bandas características do PVA. As bandas significativas estão destacadas pelas colunas A, B e C. A primeira banda observada a cerca dos 3321 cm^{-1} (coluna A) é referente às ligações dos grupos hidroxilos -OH^{70} , aos 2918 cm^{-1} (coluna B) aparece uma banda pertencente grupos C-H alquilo⁷⁰ e aos 1094 cm^{-1} (coluna C) existe uma banda importante relativa às ligações C-O do polímero.⁷⁰

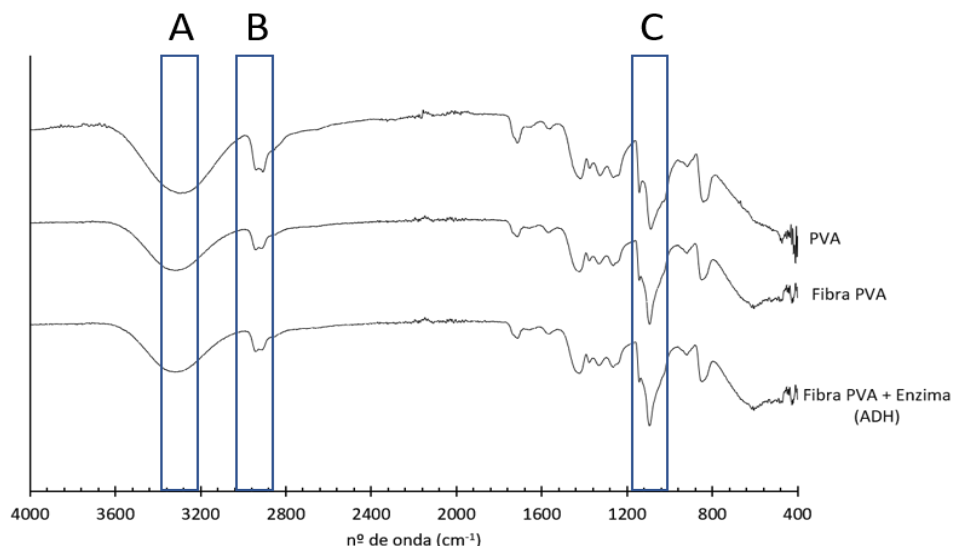


Figura 3.4. Espectros FTIR-ATR das amostras em estudo

3.1.6. Caracterização Morfológica

3.1.6.1. SEM

Foram testadas inicialmente soluções com concentrações de 7% (w/v), 8% (w/v), 9% (w/v), 9,5% (w/v) e 10% (w/v) de PVA dissolvido numa solução tampão salina tris (TBS). Verificou-se que com o aumento de concentração de PVA as fibras apresentavam um ligeiro aumento do diâmetro. No entanto, apresentavam também defeitos, tais como projeções e presença de cristais de sais. A Figura 3.5 representa uma fibra de PVA com uma concentração de 9,5% (w/v) onde é possível observar-se a presença dos cristais de sais provenientes da solução tampão.

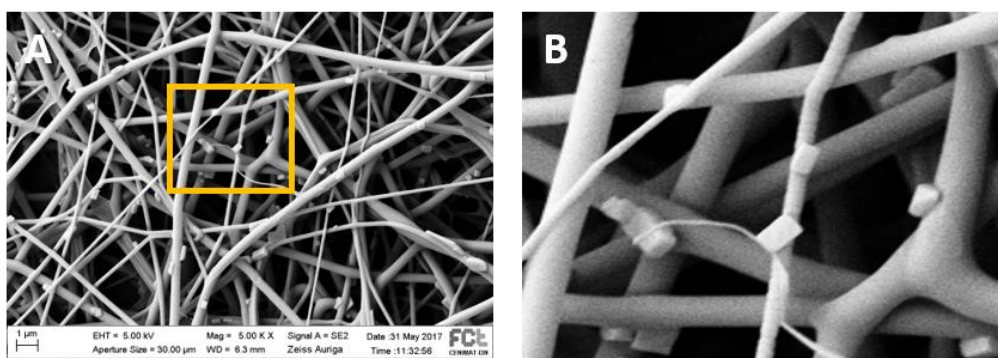


Figura 3.5. A – Imagem SEM de uma fibra de PVA 9,5% (w/v) dissolvido em TBS; B - Ampliação da região assinalada a laranja

Entre as concentrações testadas, escolheu-se a concentração de PVA 9,5% (w/v) por apresentar melhor morfologia e de forma a eliminar a presença dos cristais de sais substituiu-se o tampão salino por água destilada. Verificou-se o desaparecimento de cristais, como seria esperado, e uma redução significativa da presença de defeitos, estando as fibras mais uniformes entre si.

A Figura 3.6 apresenta a morfologia de uma fibra, obtida a partir de 1 mL de uma solução de PVA 9,5% (w/v) com cinco horas de deposição nas condições experimentais referenciadas na Tabela 3.1.

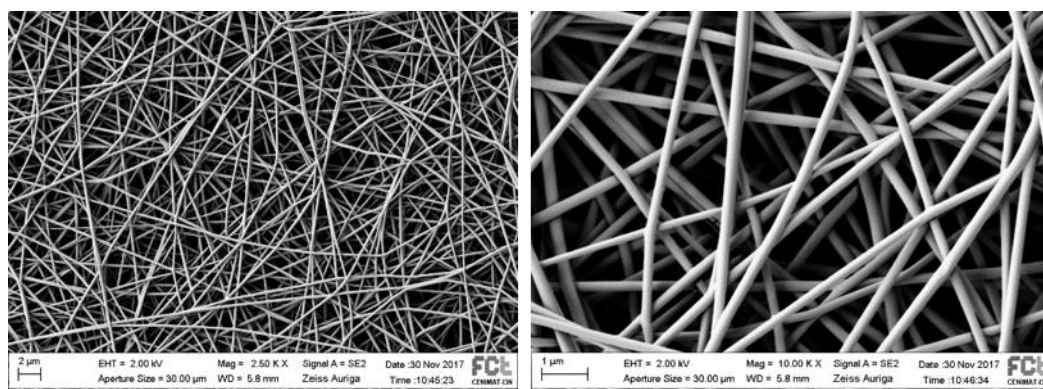


Figura 3.6. Imagens SEM de uma fibra de PVA 9,5% (w/v) (com uma ampliação de 2500x à esquerda e de 10000x à direita)

Otimizadas as fibras com o polímero, procedeu-se à adição da enzima (ADH) a uma solução de PVA 9,5% (w/v). Testaram-se as concentrações de 1 mg/mL e 10 mg/mL. A Figura 3.7 refere-se às fibras obtidas (A: [ADH]=1 mg/mL; B: [ADH]=10 mg/mL), ambas com cinco horas de deposição nas condições experimentais referenciadas na Tabela 3.1.

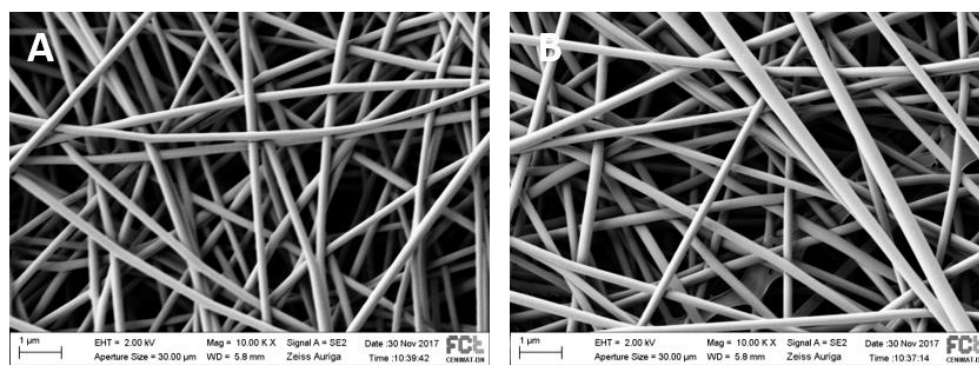


Figura 3.7. Imagens SEM de fibras de PVA 9,5% (w/v) com enzima: A - [ADH]=1 mg/ml; B - [ADH]=10 mg/ml com uma ampliação de 10000x

É possível observar um ligeiro aumento no diâmetro das fibras na concentração mais elevada, que proporcionou uma maior consistência e resistência na membrana obtida.

Devido a este facto e de forma a conseguir garantir uma quantidade suficiente de enzima para que os ensaios enzimáticos tenham resultados significativos, escolheu-se a maior concentração para a produção das fibras posteriores.

3.2. Ensaios enzimáticos

Começou por se seguir a reação de conversão de etanol em acetaldeído, acompanhando a conversão do NAD^+ em NADH por UV-Vis (ao comprimento de onda de 340 nm). No entanto existiram algumas dificuldades na obtenção de resultados, deste modo recorreu-se ao uso de um método alternativo, colorimétrico, para compreender a reação em estudo – método do MTT. Neste método é feita uma curva de calibração de forma a determinar a concentração máxima de álcool que a enzima em estudo consegue metabolizar. Utilizaram-se quatro soluções de 10 mL com diferentes concentrações de etanol: 0%, 0,01%, 0,02% e 0,03% (Figura 3.8). É possível observar-se uma zona linear até aos 0,01%, onde a partir daí se atinge uma região de saturação. Isto indica-nos que a partir de uma concentração de 0,01% a enzima já se encontra saturada, não conseguindo converter o etanol em acetaldeído.

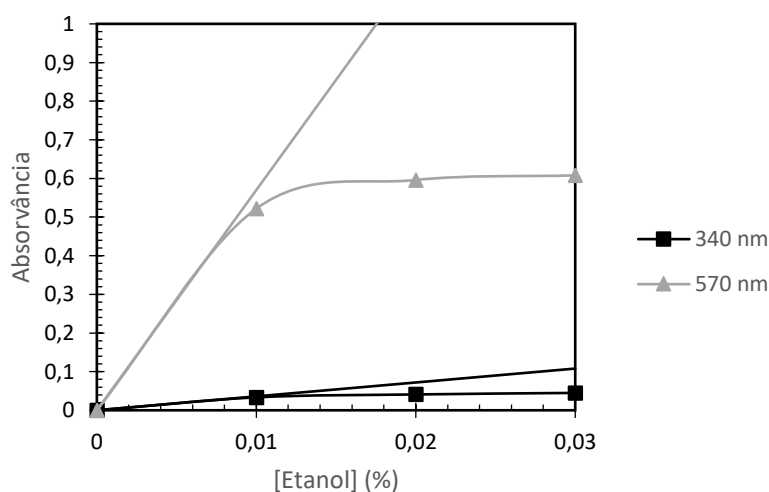


Figura 3.8. Curva de calibração para a enzima ADH

Deste modo, para garantir uma concentração de álcool que a enzima conseguisse metabolizar, para os testes de atividade utilizou-se uma concentração de etanol de 0,001%.

Os ensaios de atividade da enzima livre (Figura 3.9) foram também seguidos nos dois comprimentos de onda (340 nm e 570 nm).

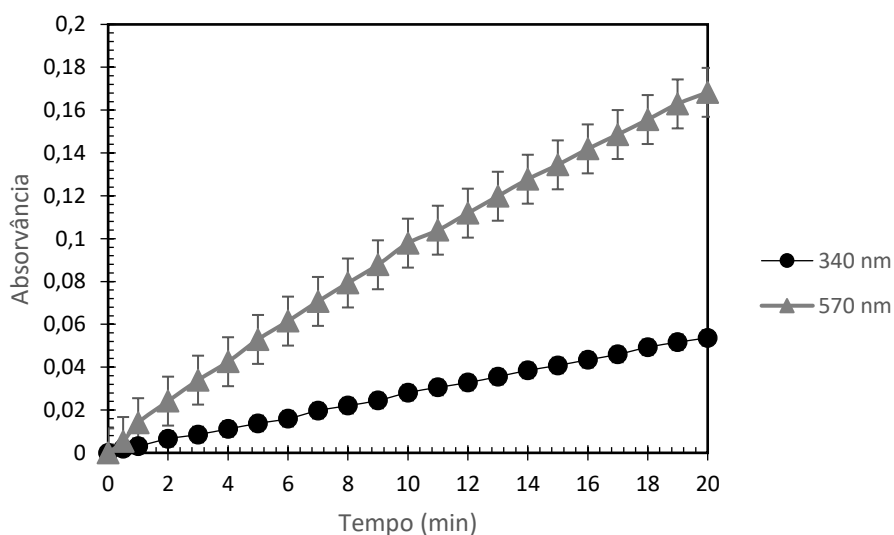


Figura 3.9. Teste de atividade enzimática

Verificou-se que é possível seguir a reação de duas formas: através do método colorimétrico descrito ou apenas pela reação de conversão NAD^+/NADH . Tendo em vista o objetivo inicial do trabalho que seria o seguimento da reação de conversão etanol/acetaldeído ou metanol/formaldeído pela conversão de NAD^+/NADH , espectrofotometricamente, e por ser um método mais prático, optou-se então por colocar de parte o método colorimétrico (ensaio MTT). Contudo seguir a reação através da conversão de NAD em NADH, pode apresentar algumas limitações, nomeadamente quando se utilizam concentrações excessiva de álcool e tempos longos de reação.

Ao otimizar os parâmetros desta reação, é possível medir a atividade da enzima ADH. Assim, a atividade da ADH será então medida segundo este método, na região do UV-vis de 340 nm, quer no caso da enzima livre bem como da enzima imobilizada nas fibras.

Sendo o NAD^+ uma espécie muito sensível, podendo reduzir-se com alguma facilidade a NADH, foi necessário confirmar se o aumento de absorvância com o tempo observado era exclusivamente da reação de conversão de etanol em formaldeído

através da adição da enzima. Para tal, realizou-se uma reação sem adição de enzima, ou seja, adicionou-se a mesma quantidade de NAD^+ e tampão a um meio apenas com água (H_2O) e a um meio com a mesma quantidade e concentração de etanol (EtOH) de anteriormente e mediram-se as absorvâncias. Verificou-se então que não existe variação dos valores de absorvância, o que é indicativo que o NAD^+ não se reduz a NADH sem a presença da enzima (Figura 3.10).

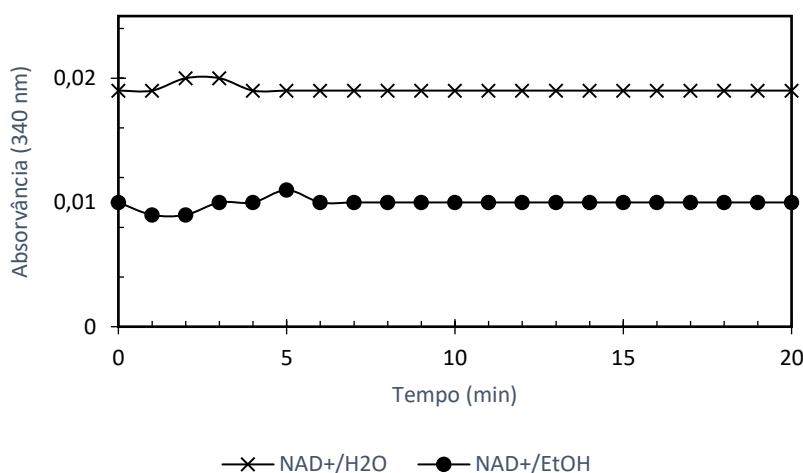


Figura 3.10. Comportamento do NAD^+ em água ou etanol ao longo do tempo

3.2.1. Imobilização enzimática

Como o PVA é hidrofílico e as fibras obtidas a partir deste polímero são solúveis em água, é importante perceber se existe lixiviação da enzima quando mergulhada em meio aquoso. Para tal, utilizou-se o método de Lowry para analisar o conteúdo de proteínas nas fibras. Por não ser possível analisar o conteúdo da fibra, analisou-se o sobrenadante onde foram mergulhadas as enzimas. Obteve-se uma percentagem de imobilização de cerca de 98%, o que indica que a quantidade de enzima colocada na solução que deu origem às fibras estará praticamente toda dentro das fibras produzidas. Contudo o facto de o processo de imobilização ter sido bem-sucedido, não significa obrigatoriamente que a enzima esteja totalmente ativa, como verificado em seguida.

3.2.2. Atividade Enzimática

Otimizado o método para a detecção da conversão de NAD^+ em NADH procedeu-se à quantificação da atividade enzimática, quer da enzima livre bem como da enzima imobilizada (Figura 3.11).

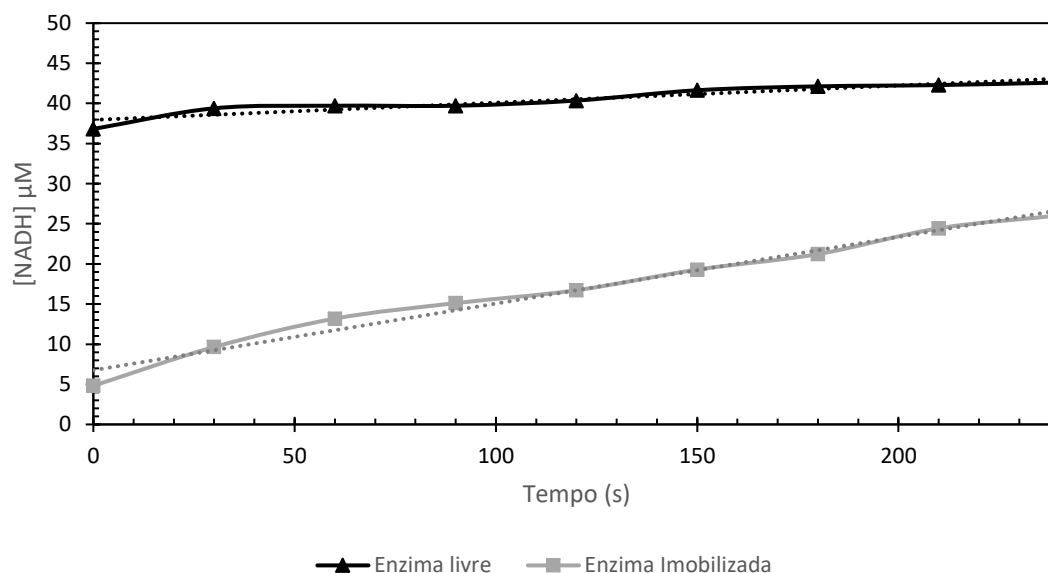


Figura 3.11. Gráfico da produção de NADH em função do tempo para o estudo da atividade da enzima livre ($y = 0,0214x + 37,942$) enzima imobilizada (1ª utilização) ($y = 0,0831x + 6,7524$)

Os ensaios foram realizados com as mesmas concentrações de enzima em ambos os casos. É possível observar no caso da enzima livre em solução, o primeiro ponto obtido está muito longe do zero, o que indica que existiu uma rápida conversão obtendo-se uma formação rápida de produto logo nos primeiros segundos da reação, neste caso NADH. O declive da reta é muito baixo, o que também indica que poderá já não estar a existir conversão de NAD^+ a NADH. Em reações de cinética química é essencial acompanhar a formação do produto desde os instantes iniciais, para que os parâmetros cinéticos possam ser determinados de forma correta. Deste modo como os tempos medidos já estão na escala dos segundos, não sendo possível uma medição mais rápida a solução foi diminuir a concentração de enzima utilizada no caso dos ensaios da enzima livre (Figura 3.12).

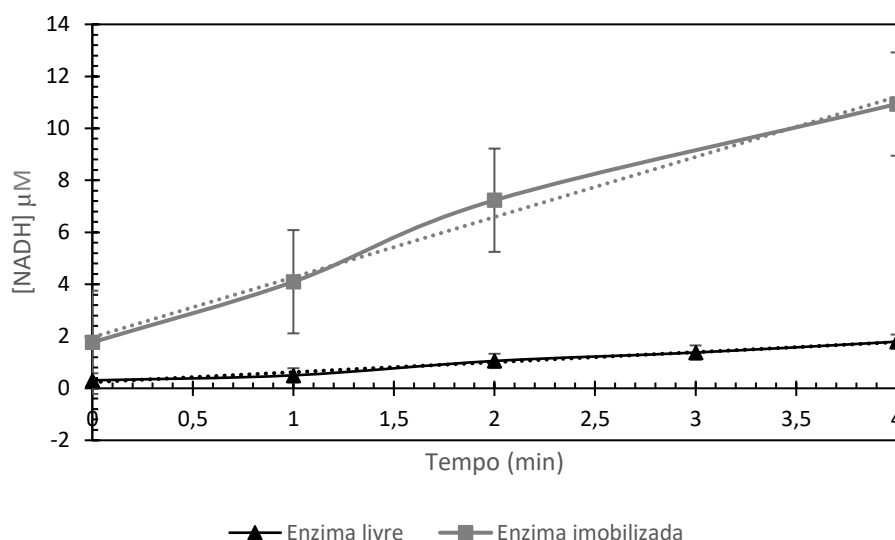


Figura 3.12 Gráfico da produção de NADH em função do tempo para o estudo da atividade da enzima livre ($y = 0,385x + 0,2347$); enzima imobilizada (1ª utilização) ($y = 2,3128x + 1,9614$)

Neste caso, foi possível seguir a reação durante um maior período de tempo. A atividade enzimática foi quantificada através do declive das retas, permitindo determinar velocidades iniciais da reação bem como valores de atividade específica. É preciso ter em atenção os volumes utilizados, no caso da enzima imobilizada foi necessário utilizar um volume maior devido à absorção por parte da fibra. No caso da enzima livre, o valor de atividade específica é de 3,9 μM/mg enz.min e para a enzima imobilizada é de 1,16 μM/mg enz.min. Pelo facto de se tratarem de fibras porosas permite que os substratos possam difundir para dentro das fibras existindo atividade, contudo por estar imobilizada a enzima poderá não estar tão disponível, não sendo tão acessível ao substrato poderá não exercer a sua atividade máxima. Outro fator poderá ser a desativação da enzima por ter sofrido alterações conformacionais durante o processo de imobilização.

De modo a testar a possível reutilização das fibras contendo a enzima ADH, a mesma fibra foi utilizada duas vezes seguidas. A possibilidade de reutilização tanto da fibra como da enzima tornam o material produzido mais economicamente viável, e aumenta o carácter sustentável da tecnologia/material proposta. A Figura 3.13 compara os resultados obtidos da atividade da enzima nas duas utilizações.

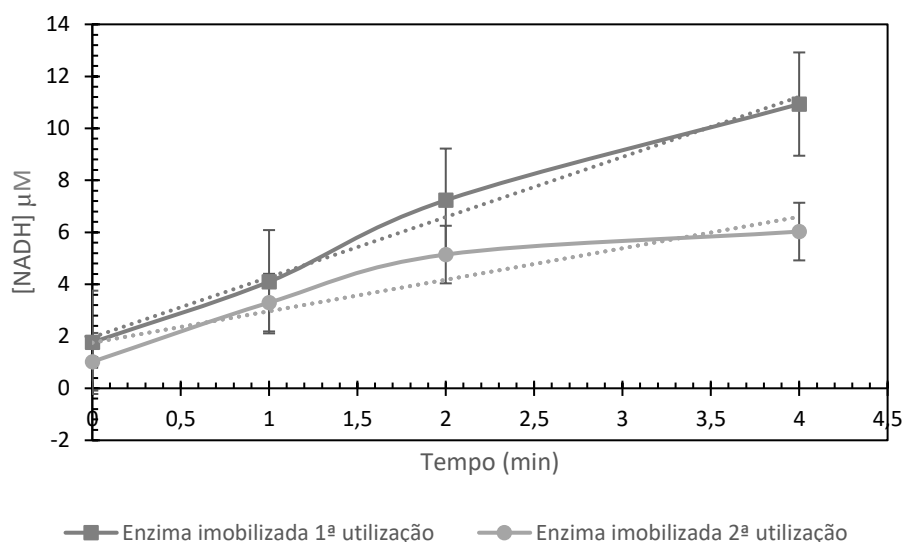


Figura 3.13. Gráfico da produção de NADH em função do tempo para o estudo da atividade da enzima imobilizada - 1ª utilização ($y = 2,3128x + 1,9614$) e da enzima imobilizada - 2ª utilização ($y = 1,21x + 1,754$)

O valor de atividade específica para a segunda utilização é 0,6 $\mu\text{M}/\text{mg enz. min}$. Observa-se que a sua reutilização é possível, mantendo pelo menos quase 50% da sua atividade observada na primeira utilização (1,16 $\mu\text{M}/\text{mg enz. min}$). Esta perda de atividade deverá estar essencialmente associada a uma perda de massa da fibra quando mergulhada no meio da reação.

3.2.1. Perda de massa

Avaliou-se a perda de massa das fibras após os ensaios enzimáticos para perceber se este fator poderia ser significativo de modo a comprometer o funcionamento da fibra.

$$\% \text{ Perda de massa} = \frac{0,042 - 0,081}{0,081} \times 100 = 48\%$$

Verificou-se uma perda de massa de 48%. O carácter hidrofílico do PVA faz com que as fibras tenham uma grande afinidade com a água sendo solúveis em meios aquosos, o que faz com parte da fibra se dissolva no decorrer dos ensaios, o que leva a que existe uma consequente perda de atividade quando a fibra é reutilizada, justificando assim a diminuição de atividade observada da primeira utilização para a segunda.

Capítulo 4

Conclusões e Perspetivas futuras

CONCLUSÕES

O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de um material polimérico, que contenha a enzima álcool desidrogenase, uma enzima envolvida no processo de conversão de CO_2 a metanol. Para isso prepararam-se fibras biocompatíveis para o encapsulamento de enzimas, através da técnica de eletrospinning, utilizando PVA como polímero. Foi efetuada caracterização morfológica, mecânica e química das fibras produzidas, nomeadamente pelas técnicas de SEM, reologia, ensaios de tração, e FTIR.

O processo de otimização da produção das fibras de PVA mostrou a influência dos vários parâmetros de eletrospinning, entre eles, foi possível concluir que a concentração de polímero teve uma maior influência na produção de fibras viáveis. O ajuste deste parâmetro teve influência na presença ou ausência de defeitos ao longo das fibras. Outros fatores importantes no processo de formação das fibras foram a percentagem de humidade e a temperatura, para valores muito baixo de humidade e temperatura a formação da fibra ficava comprometida, ocorrendo um entupimento da agulha.

As técnicas de caracterização mostraram que a enzima se encontra encapsulada na fibra, não a alterando quer em termos químicos como físicos, não tendo influência no comportamento mecânico das fibras obtidas.

Através da realização de ensaios enzimáticos foi possível verificar que a reação de conversão de etanol para acetaldeído ocorre de forma relativamente rápida. Verificou-se que a atividade específica da enzima encapsulada se mantém, ainda que mais baixa ($3,9 \mu\text{M}/\text{mg enz. min}$ para a enzima livre e $1,16 \mu\text{M}/\text{mg enz. min}$ para a enzima imobilizada). Este fator pode dever-se ao facto de a enzima não estar tão acessível ao substrato ou ter sofrido alterações conformacionais durante o processo de imobilização. Outro ponto importante e que foi explorado neste trabalho, é a reutilização da fibra. De modo tornar esta estratégia sustentável e aplicável, a reutilização do material produzido deve ser tida em conta. Nos ensaios de reutilização da fibra, apesar de o valor de atividade específica da enzima ser menor ($0,6 \mu\text{M}/\text{mg enz. min}$), conclui-se que a enzima continua ativa. Isto aumenta a viabilidade do processo economicamente, e confere maior sustentabilidade ao processo.

PERSPETIVAS FUTURAS

No trabalho realizado nesta tese não foi possível comprovar o funcionamento da cascata enzimática, pois este é um sistema altamente complexo. No entanto, os resultados obtidos comprovam a viabilidade do projeto. Assim, existem algumas tarefas futuras que deverão ser realizadas de modo a atingir o objetivo da conversão de CO_2 a metanol (Figura 4.1).

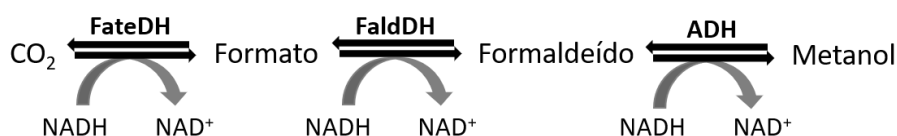


Figura 4.1. Reação de conversão enzimática de CO_2 a metanol

Será necessário estudar as reações enzimáticas substituindo o substrato, utilizando metanol, recriando assim a última reação do sistema enzimático. Deverá ser encapsulado o cofator NAD^+ na fibra, juntamente com a enzima ADH, de forma a continuar os testes de caracterização já iniciados e provar o seu funcionamento dentro da fibra. Deste modo, a reutilização do cofactor pode também ser conseguida. Concluído este processo deverão ser encapsuladas na fibra as restantes enzimas da cascata, uma por uma, testando o funcionamento de cada reação até chegar à cascata final, sem esquecer todos os ensaios de caracterização que ajudam a perceber o funcionamento e a influência que cada enzima terá. Por último, provado o funcionamento do sistema biocatalítico, deverá ser trocado o cofator para NADH e utilizar CO_2 como substrato para a obtenção de metanol.

Outro ponto importante a ser estudado, será o comportamento das fibras para a sua reutilização, de forma a ser tirado o máximo partido de cada fibra produzida. Deverão ser efetuados testes de solubilidade e de perda de massa para compreender o seu comportamento. Poderão também ser efetuados tratamentos de reticulação das fibras de forma a torná-las insolúveis e assim evitar perdas de massa por dissolução.

BIBLIOGRAFIA

1. Anastas, P. & Eghbali, N. Green Chemistry: Principles and Practice. *Chem. Soc. Rev.* **39**, 301–312 (2010).
2. Olah, G. A., Goeppert, A. & Prakash, G. K. S. Chemical recycling of carbon dioxide to methanol and dimethyl ether: From greenhouse gas to renewable, environmentally carbon neutral fuels and synthetic hydrocarbons. *J. Org. Chem.* **74**, 487–498 (2009).
3. Cycle of Carbon. Available at: https://www.sciencelearn.org.nz/image_maps/3-carbon-cycle.
4. Tursunov, O., Kustov, L. & Kustov, A. A Brief Review of Carbon Dioxide Hydrogenation to Methanol Over Copper and Iron Based Catalysts. *Oil Gas Sci. Technol. – Rev. d'IFP Energies Nouv.* **72**, 30 (2017).
5. Luo, J., Meyer, A. S., Mateiu, R. V. & Pinelo, M. Cascade catalysis in membranes with enzyme immobilization for multi-enzymatic conversion of CO₂ to methanol. *N. Biotechnol.* **32**, 319–327 (2015).
6. Olah, G. A., Goeppert, A. & Prakash, G. K. S. Beyond Oil and Gas: The Methanol Economy: Second Edition. *Beyond Oil Gas Methanol Econ. Second Ed.* 1–334 (2009). doi:10.1002/9783527627806
7. THE KEELING CURVE. Available at: https://scripps.ucsd.edu/programs/keelingcurve/wp-content/plugins/sio-blumoon/graphs/mlo_full_record.png. (Accessed: 12th December 2017)
8. Ā, J. G. & Chalmers, H. Carbon capture and storage \$. **36**, 4317–4322 (2015).
9. Benson, S. M. & Orr, F. M. Carbon Dioxide Capture and Storage. 303–306 (2008).
10. Santos, T. C. & Ronconi, C. M. Artigo Captura de CO₂ em Materiais Híbridos CO₂ Capture in Hybrid Materials Captura de CO₂ em Materiais Híbridos. **6**, 112–130 (2014).
11. Beckman, E. J. Supercritical and near-critical CO₂ in green chemical synthesis and processing. *J. Supercrit. Fluids* **28**, 121–191 (2004).
12. Leitner, W. Designed to dissolve. *Nature* **405**, 129–30 (2000).
13. Skouta, R. *Selective chemical reactions in supercritical carbon dioxide, water, and ionic liquids. Green Chemistry Letters and Reviews* **2**, (2009).
14. Pereira, P. A. D. P. & De Andrade, J. B. Fontes, reatividade e quantificação de metanol e etanol na atmosfera. *Quim. Nova* **21**, 744–754 (1998).
15. Galindo Cifre, P. & Badr, O. Renewable hydrogen utilisation for the production of methanol. *Energy Convers. Manag.* **48**, 519–527 (2007).
16. World consumption of methanol. Available at: <https://www.ihs.com/products/methanol-chemical-economics-handbook.html>.

17. Guoxiang Liu (Ed.). *Recent Advances in Catalytic/Biocatalytic Conversion of Greenhouse Methane and Carbon Dioxide to Methanol and Other Oxygenates, Greenhouse Gases - Capturing, Utilization and Reduction*. (2012).
18. Zhai, R., Zheng, N., Rizak, J. & Hu, X. Evidence for Conversion of Methanol to Formaldehyde in Nonhuman Primate Brain. *Anal. Cell. Pathol.* **2016**, 1–6 (2016).
19. J. A. Kruse. Methanol Poisoning. *Intensive Care Med* **18**, 391–397 (1992).
20. Design, S. & Criteria, E. The New England Journal of Medicine FOMEPIZOLE FOR THE TREATMENT OF METHANOL POISONING. **344**, 424–429 (2001).
21. Kuk, S. K. *et al.* Communications Biocatalytic Photosynthesis Hot Paper Photoelectrochemical Reduction of Carbon Dioxide to Methanol through a Highly Efficient Enzyme Cascade. 3827–3832 (2017). doi:10.1002/anie.201611379
22. Zheng, Y. *et al.* Energy related CO₂ conversion and utilization: Advanced materials/nanomaterials, reaction mechanisms and technologies. *Nano Energy* **40**, 512–539 (2017).
23. Liu, X.-M., Lu, G. Q., Yan, Z.-F. & Beltramini, J. Recent Advances in Catalysts for Methanol Synthesis via Hydrogenation of CO and CO₂. *Ind. Eng. Chem. Res.* **42**, 6518–6530 (2003).
24. Kuwabata, S., Tsuda, R. & Yoneyama, H. Electrochemical Conversion of Carbon Dioxide to Methanol with the Assistance of Formate Dehydrogenase and Methanol Dehydrogenase as Biocatalysts. 1988–1994 (1994).
25. Marpani, F., Pinelo, M. & Meyer, A. S. Enzymatic conversion of CO₂ to CH₃OH via reverse dehydrogenase cascade biocatalysis: Quantitative comparison of efficiencies of immobilized enzyme systems. *Biochem. Eng. J.* **127**, 217–228 (2017).
26. Obert, R. & Dave, B. C. Enzymatic Conversion of Carbon Dioxide to Methanol: Enhanced Methanol Production in Silica Sol - Gel Matrices. 12192–12193 (1999). doi:10.1021/ja991899r
27. Amao, Y. & Watanabe, T. Photochemical and enzymatic synthesis of methanol from formaldehyde with alcohol dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae* and water-soluble zinc porphyrin. **44**, 27–31 (2007).
28. Shi, J. *et al.* Enzymatic conversion of carbon dioxide. *Chem. Soc. Rev.* **44**, 5981–6000 (2015).
29. Soc, C., Sheldon, R. A. & Pereira, P. C. Chem Soc Rev Biocatalysis engineering: the big picture †. *Chem. Soc. Rev.* **46**, 2678–2691 (2017).
30. Pellis, A., Cantone, S., Ebert, C. & Gardossi, L. Evolving biocatalysis to meet bioeconomy challenges and opportunities. *N. Biotechnol.* **40**, 154–169 (2018).
31. Goubet, I., Graber, M., Lamare, S., Maugard, T. & Legoy, M. D. Solid / Gas Biocatalysis. **82**, 255–278 (2008).
32. Buchholz, K., Kasche, V. & T. Bornscheuer, U. *Biocatalysts and Enzyme Technology*.

(2004).

33. Wen, N., Liu, W., Hou, Y. & Zhao, Z. The kinetics behavior of the reduction of formaldehyde catalyzed by alcohol dehydrogenase (ADH) and partial uncompetitive substrate inhibition by NADH. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **170**, 370–380 (2013).
34. Leskovac, V., Trivić, S. & Pericin, D. The three zinc-containing alcohol dehydrogenases from baker's yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* **2**, 481–494 (2002).
35. Raj, S. B., Ramaswamy, S. & Plapp, B. V. Yeast Alcohol Dehydrogenase Structure and Catalysis Yeast Alcohol Dehydrogenase Structure and Catalysis Byline Corresponding author. **49400**, 1–17 (2014).
36. Mateo, C., Palomo, J. M., Fernandez-lorente, G., Guisan, J. M. & Fernandez-lafuente, R. Improvement of enzyme activity , stability and selectivity via immobilization techniques. **40**, 1451–1463 (2007).
37. Bornscheuer, U. T. Immobilizing Enzymes: How to Create More Suitable Biocatalysts. 3336–3337 (2003). doi:10.1002/anie.200301664
38. Mohamad, N. R., Marzuki, N. H. C., Buang, N. A., Huyop, F. & Wahab, R. A. An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* **29**, 205–220 (2015).
39. Guzik, U. & Hupert-kocurek, K. Immobilization as a Strategy for Improving Enzyme Properties-Application to Oxidoreductases. 8995–9018 (2014). doi:10.3390/molecules19078995
40. Tran, D. N. & Balkus, K. J. Enzyme immobilization via electrospinning. *Top. Catal.* **55**, 1057–1069 (2012).
41. Altinkaynak, C., Tavlasoglu, S., Özdemir, N. & Ocsoy, I. Enzyme and Microbial Technology A new generation approach in enzyme immobilization : Organic-inorganic hybrid nanoflowers with enhanced catalytic activity and stability. *Enzyme Microb. Technol.* **93–94**, 105–112 (2016).
42. Resende, R. R., Tereza, L., Souza, D. A. & Mendes, A. A. Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria - Vol. 4. 529–530 (2017).
43. Datta, S. & Christena, L. R. Enzyme immobilization : an overview on techniques and support materials. 1–9 (2013). doi:10.1007/s13205-012-0071-7
44. Pirzada, T., Arvidson, S. A., Saquing, C. D., Shah, S. S. & Khan, S. A. Hybrid Silica – PVA Nanofibers via Sol – Gel Electrospinning. (2012). doi:dx.doi.org/10.1021/la300049j
45. Li, D. & Xia, Y. Electrospinning of nanofibers: Reinventing the wheel? *Adv. Mater.* **16**, 1151–1170 (2004).
46. Park, J. C. *et al.* Electrospun poly(vinyl alcohol) nanofibers: Effects of degree of hydrolysis and enhanced water stability. *Polym. J.* **42**, 273–276 (2010).

47. Li, Z. & Materials, F. *Zhenyu Li · Ce Wang One-Dimensional Nanostructures Electrospinning Technique and Unique Nanofibers*. (2016).
48. Deitzel, J. ., Kleinmeyer, J., Harris, D. & Beck Tan, N. . The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles. *Polymer (Guildf)*. **42**, 261–272 (2001).
49. Oliveira, L. M. B. Automatização e controlo de um sistema de electrospinning. *Univ. do Minho. Esc. Eng. Mestr. em Eng. Mecatrônica*. 87 (2011).
50. Instruction, N. C. Scanning Electron Micro s cope.
51. Reimer, L. *Scanning Electron Microscopy: Physics of Image Formation and Microanalysis*. (Springer).
52. Chhabra, R. P. Non-Newtonian Fluids : An Introduction. 1–33
53. Sojoudi, A. & Saha, S. C. Shear Thinning and Shear Thickening Non- Newtonian Confined Fluid Flow Over Rotating Cylinder. **2**, 117–121 (2012).
54. The Young Modulus (E) - the modulus of elasticity. Available at: http://www.cyberphysics.co.uk/topics/forces/young_modulus.htm.
55. Silverstein, R., Webster, F., Kiemle, D. & Bryce, D. *Spectrometric Identification of Organic Compounds. Organic Chemistry* (2014). doi:10.1021/ja00903a077
56. PerkinElmer. FT-IR Spectroscopy Attenuated Total Reflectance (ATR). *PerkinElmer Life Anal. Sci.* 1–5 (2005). doi:007024B_01
57. Technologies, P. A PPLICATION N OTE ATR – Theory and Applications. (2011).
58. Tougaard, S. Surface nanostructure determination by x-ray photoemission spectroscopy peak shape analysis. **14**, 1415–1423 (1996).
59. Drioli, E. & Lidiatta, G. *COMPREHENSIVE MEMBRANE SCIENCE AND ENGINEERING*. (Elsevier B.V.).
60. ELECTRONICS, P. XPS / ESCA. (2018). Available at: <https://www.phl.com/surface-analysis-techniques/xps-esca.html>.
61. Why does NADH have 2 peaks in its absorption spectrum but NAD⁺ has only one? Available at: <https://chemistry.stackexchange.com/questions/63186/why-does-nadh-have-2-peaks-in-its-absorption-spectrum-but-nad-has-only-one>.
62. SIGMA-ALDRICH. Alcohol Dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae* - Product Information. **287**, 8–9 (1993).
63. Sigma brand products are sold through Sigma-Aldrich, Inc. Sigma-Aldrich, Inc. warrants that its products conform to the information contained in this and other Sigma-Aldrich publications. Purchaser must determine the suitability of the product(s) for their particular use. Additional terms and conditions may apply. Please see reverse side of the invoice or packing slip. **2756**, 2756 (1993).
64. Technology, M. & Peres, F. S. Colorimetric assay of ethanol using alcohol dehydrogenase from dry baker æ™ s yeast from dry baker ’ s yeast. 6–11 (2015).

doi:10.1016/j.enzmictec.2006.07.029

65. Schagger, H., Cramer, W. A. & Vonjagow, G. The folin by oliver. *Anal. Biochem.* **217**, 220–230 (1994).
66. Zaia, D. A. M., Zaia, C. T. B. V & Lichtig, J. Determina???o de prote??nas totais via espectrofometria: Vantagens e desvantagens dos m??todos existentes. *Quim. Nova* **21**, 787–793 (1998).
67. Zhang, C. & Yuan, X. EUROPEAN POLYMER Study on morphology of electrospun poly (vinyl alcohol) mats. **41**, 423–432 (2005).
68. Ding, B. I. N. *et al.* Preparation and Characterization of a Nanoscale Poly (vinyl alcohol) Fiber Aggregate Produced by an Electrospinning Method. 1261–1268 (2002). doi:10.1002/polb.10191
69. EletrospinTech. Membrane separation from collector. Available at: http://electrospintech.com/fibermemseparation.html#.WoslGahl_IW.
70. Fonseca, E., Fábila, S. & Sander, H. Synthesis and Characterization of Poly (Vinyl Alcohol) Hydrogels and Hybrids for rMPB70 Protein Adsorption. **9**, 185–191 (2006).

APÊNDICES

Apêndice 1 – Curva de calibração usada na quantificação de proteínas

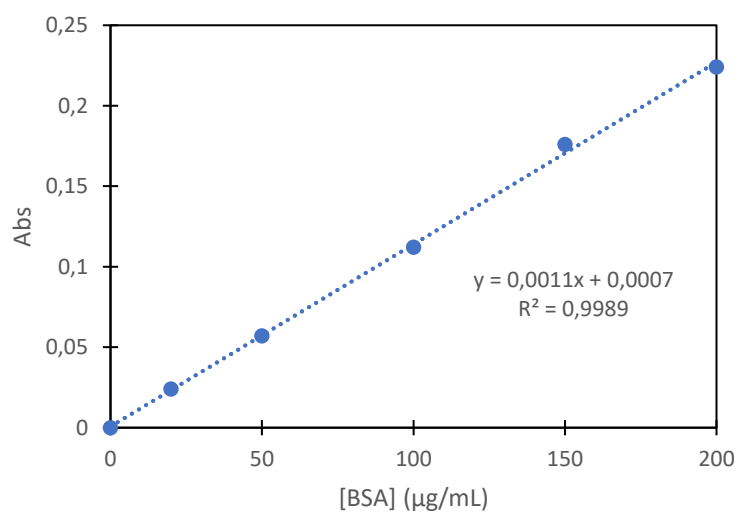


Figura 6.1. Reta de calibração utilizadas para a quantificação de proteína total das fibras com enzima imobilizada pelo método de Lowry.